

**EKSPRESI DAN AKTIVASI SUB UNIT p65 NF- B PADA SEL
MONONUKLEAR PENDERITA SINDROM NEFROTIK RESISTEN
STEROID ANAK**

TESIS



**Oleh :
dr. Brigitta Ida RV Corebima
NIM. 0521309001-09**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
DEPARTEMEN ILMU KESEHATAN ANAK
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
RSU Dr. SAIFUL ANWAR
MALANG
2010**

LEMBAR PERSETUJUAN

TESIS

**EKSPRESI DAN AKTIVASI SUB UNIT p65 NF- B PADA SEL MONONUKLEAR
PENDERITA SINDROM NEFROTİK RESISTEN STEROID ANAK**

Oleh :

dr. Brigitta Ida RV Corebima

KOMISI PEMBIMBING :

dr. Krisni Subandiyah, SpA(K)

Dr. dr. Loeki Enggar Fitri, MKes., SpParK

Disetujui untuk dipresentasikan di depan penguji
pada tanggal : 6 Mei 2010

Malang, Maret 2010

Program Studi Magister Biomedik

Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya Malang

Komisi Pembimbing :

dr. Krisni Subandiyah, SpA(K)

KETUA

Dr.dr. Loeki Enggar Fitri, Mkes., SpParK

ANGGOTA

**EKSPRESI DAN AKTIVASI SUB UNIT p65 NF- B PADA SEL MONONUKLEAR
PENDERITA SINDROM NEFROTIK RESISTEN STEROID ANAK**

Nama mahasiswa : dr. Brigitta Ida RV Corebima
NIM : 08020708018
Program studi : Magister Biomedik

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : dr.Krisni Subandiyah, SpA(K)
Anggota : Dr.dr. Loeki Enggar Fitri, MKes., SpPark

TIM PENGUJI

Dosen Penguji 1 : Dr. dr. Setyawati Karyono, MKes
Dosen Penguji 2 : dr. Niniek Soemiarso.,SpA(K), MMPaed

Tanggal Ujian : 6 Mei 2010
SK Penguji :

RIWAYAT HIDUP

Brigitta Ida Resita Vebrianti Corebima, dr. lahir di Malang, 16 Oktober 1978, anak ke-1 dari Prof.DR. Duran Corebima, MPd dan Maria Goretti Susiani. Menyelesaikan pendidikan di SDK Santa Maria II Malang tahun 1990, SMPK Santa Maria II Malang, tahun 1993, SMUK St. Albertus Malang tahun 1996, dan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang tahun 2002. Saat ini sedang menyelesaikan Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran dan Program Studi Magister Biomedik Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar- besarnya kepada :

1. Prof.Dr.dr. Soemarno, DMM.,SpMK selaku Ketua Program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. dr. Soemakto, SpA(K) selaku Ketua Program Studi dan dr. Krisni Subandiyah, SpA(K) selaku Sekretaris Program Studi PPDS-1 IKA Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, yang selalu membimbing, mendorong, dan memberikan fasilitasi dalam penyelesaian tesis ini.
3. dr. Krisni Subandiyah, Sp.A(K) dan Dr. dr. Loeki Enggar Fitri, MKes.,SpParK selaku Komisi Pembimbing, yang telah bersedia meluangkan waktu untuk membimbing dan memberikan motivasi kepada penulis sehingga tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.
4. Dr. dr. Setyawati Karyono, MKes selaku penguji I, dan dr. Niniek Soemiarso,SpA(K), MMPaed selaku penguji II yang bersedia menguji dan memberikan saran untuk penyempurnaan tesis ini.
5. Rania Monica Sumbogo, putri tersayang, yang selalu mendampingi dalam penyelesaian tesis ini.
6. Orang tua penulis Prof. DR. Duran Corebima, MPd dan Maria Goretti Susiani untuk nasehat-nasehat yang memotivasi untuk terus maju, serta seluruh keluarga besar yang mendoakan dan mendorong penulis menyelesaikan tesis ini.
7. Rekan-rekan PPDS-IKA angkatan Januari 2006, dr. Khairiyadi, dr. Saptadi Yulianto, dr Susan, dr. Dessy Setyawati dan dr. Diana Anggarani S. yang telah bersama-sama menempuh pendidikan dan saling memberikan semangat.
8. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah banyak memberikan bantuan, saran dan masukan demi selesainya tesis ini.

ABSTRAK

Resisten steroid merupakan tanda prognosis yang buruk pada nefrotik sindrom, tetapi mekanismenya masih belum jelas. *Nuclear factor- B* (NF- B) telah dilaporkan mempengaruhi kerja glukokortikoid pada sel T melalui transrepresi reseptor glukokortikoid. Sampai saat ini, penelitian tentang hal ini masih sangat terbatas. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan adanya perbedaan ekspresi dan aktivasi subunit p65 NF- B pada sindrom nefrotik resisten steroid dibandingkan dengan sindrom nefrotik sensitif steroid pada anak. Penelitian *cross-sectional* dilakukan dari Januari 2009 sampai Desember 2009 di Laboratorium/SMF Ilmu Kesehatan Anak, RSUD Dr. Saiful Anwar, Malang dan Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya. Ekspresi subunit p65 NF- B dan aktivasi subunit p65 NF- B ditentukan dengan menggunakan pemeriksaan imunositokimia dengan menghitung jumlah limfosit yang mengekspresikan dan mengaktivasi subunit p65 NF- B per 200 sel di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 kali. Hasil dianalisa dengan independent t-test dengan interval kepercayaan 95% ($p < 0.05$) dan korelasi Pearson. Tidak ada perbedaan ekspresi subunit p65 NF- B pada kelompok dengan SNRS dan SNSS ($p = 0,153$). Didapatkan peningkatan aktivasi subunit p65 NF- B pada kelompok SNRS dibandingkan dengan kelompok SNSS ($p = 0,000$). Tidak ditemukan korelasi antara ekspresi dan aktivasi subunit p65 NF- B ($r = 102$, $p = 0,668$). Sebagai kesimpulan peningkatan aktivasi subunit p65 NF- B ditemukan pada sindrom nefrotik resisten steroid, namun tidak berhubungan dengan ekspresi subunit p65 NF- B.

Kata kunci: Sindrom nefrotik, resisten steroid, ekspresi & aktivasi subunit p65 NF- B

ABSTRACT

Resistance to steroid therapy is a poor prognosis sign for nephrotic syndrome, but this mechanism is still unclear. NF- κ B has been reported to affect the glucocorticoid at the T cell through the transrepression in the glucocorticoid receptor. Until now, this study was still limited. The aim of this study was to show the difference expression and activation of NF- κ B p65 subunit between childhood SRNS and SSNS patient. Cross sectional study was conducted during January 2009 to December 2009 in the Saiful Anwar General Hospital and Biomedic Laboratory Brawijaya University. Expression and activation of NF- κ B p65 subunit were determined by immunohistochemistry staining by counting the amount of lymphocyte that express and activate NF- κ B p65 subunit among 200 lymphocytes under light microscope with 1000 magnification. Results were analyzed with independent t test with 95% CI ($p < 0,05$) and Pearson correlation. The result of this study revealed no significant difference of expression of NF- κ B p65 subunit between SRNS and SSNS ($p = 0,153$), but there was an increase activation of NF- κ B p65 subunit in the SRNS patients ($p = 0,000$). However, we did not find any correlation between expression and activation of NF- κ B p65 subunit ($r = 0.102$, $p = 0.668$). We conclude that increasing of activation of NF- κ B p65 subunit can cause resistance to steroid therapy but it is not related with the expression of NF- κ B p65 subunit.

Keyword: Nephrotic syndrome, steroid resistancy, expression and activation NF- κ B p65 subunit

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa penulis panjatkan, atas kekuatan, rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul EKSPRESI DAN AKTIVASI SUB UNIT p65 NF- B PADA SEL MONONUKLEAR PADA PENDERITA SINDROM NEFROTİK RESISTEN STEROID ini dengan baik.

Penulis berharap makalah ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan penanganan penderita sindrom nefrotik.

Semoga segala bantuan dan pengorbanan yang diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Tuhan Yang Maha Esa.

Malang, Mei 2010

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PERSETUJUAN.....	i
RIWAYAT HIDUP.....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan masalah.....	3
1.2.1 Sub masalah.....	4
1.3 Tujuan.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat di bidang ilmiah dan penelitian.....	5
1.4.2 Manfaat untuk pasien.....	5
BAB 2 TINJAUAN KEPUSTAKAAN	6
Definisi dan Klasifikasi Sindrom Nefrotik.....	6

2.2 Patogenesis Sindrom Nefrotik.....	8
2.2.1 Aspek Anatomis.....	8
2.2.2 Aspek Genetik.....	10
2.2.3 Aspek Immunologik.....	15
2.3 <i>Nuclear Factor Kappa B</i> (NF- B).....	18
2.3.1 Struktur dan Fungsi NF- B.....	19
2.3.2 Mekanisme Aktivasi NF- B.....	21
2.3.3 Hubungan Aktivasi NF- B dan Sindrom Nefrotik.....	23
2.4 Ekspresi Subunit p65 NF- B pada Sindrom Nefrotik.....	26
BAB 3 Kerangka Konseptual dan Hipotesis Penelitian.....	31
3.1 Kerangka Konsep.....	31
3.2 Hipotesis Penelitian.....	33
BAB 4 Metode Penelitian.....	34
4. 1 Rancangan penelitian.....	34
4.2 Tempat dan waktu	
penelitian.....	34
4.3 Populasi penelitian.....	34
4.4 Persetujuan penelitian.....	35
4.5 Sampel penelitian.....	35
4.6 Kriteria inklusi dan eksklusi sampel.....	35

4.6.1 Kriteria inklusi subjek penelitian.....	35
4.6.2 Kriteria eksklusi subjek penelitian.....	36
4.7 Besar sampel.....	36
4.8 Variabel penelitian.....	36
4.8.1 Variabel bebas.....	36
4.8.2 Variabel tergantung.....	36
4.9 Definisi operasional.....	37
4.10 Metode pemeriksaan laboratorium NF- B.....	38
4.10.1 Alat.....	38
4.10.2 Bahan <i>Imunostaining</i>	39
4.11. Prosedur Penelitian.....	39
4.11.1 Isolasi PBMC.....	39
4.11.2 Prosedur imunositokimia dan pengamatan ekspresi/aktivasi NF B pada Limfosit T.....	40
4.12 Analisa statistik.....	41
4.13 Kerangka operasional.....	42
BAB 5. Hasil Penelitian.....	43
5.1 Karakteristik Sampel.....	43
5.2 Perbandingan Ekspresi Subunit p65 NF- B antara Kelompok SNRS dan SNSS.....	43
5.3 Perbandingan Aktivasi Subunit p65 NF- B antara Kelompok SNRS dan SNSS.....	45
5.4 Hubungan antara Ekspresi Subunit p65 NF- B dan Aktivasi Subunit	

p65 NF- B.....	46
BAB 6. Pembahasan.....	48
BAB 7. Simpulan dan Saran.....	54
DAFTAR PUSTAKA.....	55
LAMPIRAN.....	58

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Gambaran histopatologi pada sindrom nefrotik idiopatik.....	7
Gambar 2.2. Gambaran mikroskop elektron pada dinding kapiler glomerulus normal dan sindrom nefrotik.....	10
Gambar 2. 3. Mutasi protein podosit.....	12
Gambar 2. 4. Anatomi molekular <i>foot processes</i> podosit.....	14
Gambar 2.5. Jalur Diferensiasi T Helper (Th).....	17
Gambar 2.6. Skema diagram struktur protein NF- B.....	20
Gambar 2.7. Mekanisme umum aktivasi NF- B.....	22
Gambar 2.8. Urutan peristiwa yang mengarah pada respon sel T yang abnormal pada sindrom nefrotik	25
Gambar 2.9.Represi sinyal NF- B yang diperantarai GR.....	29
Gambar 5.1. Karakteristik sampel berdasarkan usia.....	43
Gambar 5.2. Karakteristik sampel berdasarkan berat badan.....	43
Gambar 5.3. Perbandingan Ekspresi subunit p65 NF- B pada Kedua Kelompok (SNRS & SNSS).....	44
Gambar 5.4. Ekspresi Subunit p65 NF-KB pada Penderita SNRS (A) dan Penderita SNSS (B) dengan Teknik Imunositokimia.....	45
Gambar 5.5. Perbandingan Aktivasi subunit p65 NF- B pada Kedua Kelompok (SNRS & SNSS).....	45
Gambar 5.6. Aktivasi Subunit p65 NF- B pada Penderita SNRS(A) dan Penderita SNSS(B) dengan Teknik Imunositokimia.....	46
Gambar 5.7. Hubungan antara Ekspresi subunit p65 NF- B dan Aktivasi subunit p65 NF- B.....	46

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Karakteristik dasar sampel pada kelompok SNRS dan SNSS.....	43
---	----

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sindrom nefrotik merupakan penyakit glomerulus yang ditandai oleh gejala albuminuria, hipoalbuminemia, dan edema, yang umumnya disertai hiperkolesterolemia, serta kadang-kadang disertai hematuria, hipertensi, dan penurunan fungsi ginjal (Bagga & Mantan, 2005).

Sampai saat ini sindrom nefrotik idiopatik merupakan jenis penyakit ginjal terbanyak pada anak. Disebutkan dari 251 anak penderita sindrom nefrotik berumur 3-15 tahun, 85% diantaranya adalah penderita sindrom nefrotik idiopatik, sedangkan 15% adalah penderita sindrom nefrotik sekunder (Hodson, 2000). Di Laboratorium/SMF Ilmu Kesehatan Anak RSU Dr. Saiful Anwar Malang dalam penelitian selama 5 tahun, antara 1996-2001 dari 6 jenis penyakit ginjal ditemukan 74% diantaranya adalah penderita sindrom nefrotik idiopatik (Krisni, 2001).

Pembagian sindrom nefrotik idiopatik ada 2 macam, yaitu berdasar gambaran histopatologi dan berdasar respon terhadap pengobatan standar steroid. Berdasarkan gambaran histopatologi sindrom nefrotik idiopatik dibagi atas sindrom nefrotik kelainan minimal (SNKM) dan sindrom nefrotik kelainan non minimal (SNKNM). Sedangkan berdasarkan respon terhadap pengobatan standar steroid, dikelompokkan dalam sindrom nefrotik sensitif steroid (SNSS) dan sindrom nefrotik resisten steroid (SNRS). Disebut SNSS bila mengalami remisi dalam 4 minggu pengobatan dengan steroid sedangkan bila tidak mengalami remisi dalam 4 minggu pengobatan steroid disebut SNRS (Yap, Cheung, *et al*, 1999; UKK Nefrologi, 2008). Walaupun

persentase SNRS relatif kecil tetapi 50% penderita SNRS ini akan berkembang menjadi gagal ginjal terminal dalam waktu 1-4 tahun. SNRS merupakan salah satu penyebab gagal ginjal terminal yang sulit diatasi pada penderita berumur kurang dari 20 tahun. Meningkatnya penderita yang resisten steroid selama pengamatan sindrom nefrotik pada anak merupakan masalah klinis yang serius (Bagga & Mantan, 2005; UKK Nefrologi, 2008). Sementara ini belum ada penjelasan yang pasti mengapa ada penderita sindrom nefrotik yang berespon terhadap steroid (SNSS) dan yang lainnya resisten steroid (SNRS). Respon terhadap terapi glukokortikoid adalah suatu indikator yang penting untuk perjalanan penyakit sindrom nefrotik. (Orth & Ebenhard, 1998).

Salah satu hipotesis patogenesis sindrom nefrotik idiopatik adalah karena disfungsi sel T. Didapatkan keterlibatan berbagai macam sitokin, antara lain *interleukin 2* (IL-2), IL-4, IL-12, *interferon gamma* (IFN- γ), dan *platelet-activating factor* (PAF) dalam patofisiologi sindrom nefrotik idiopatik (Cho, *et al*, 2007). Ekspresi dari sitokin memerlukan regulasi dari *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) yang merupakan faktor transkripsi yang penting dalam ikatan DNA dengan protein (Israel & Kromer, 2006; Baldwin, 2001; Perkins & Gilmore, 2006).

Nuclear factor B (NF- κ B) merupakan faktor transkripsi yang penting dalam ikatan DNA dengan protein (Baldwin, 2001; Perkins & Gilmore, 2006). *Nuclear factor B* (NF- κ B) adalah heterodimer subunit p50 dan p65 sebagai bentuk inaktif dalam sitoplasma dengan inhibitor kappa B (I κ B) dan setelah translokasi dari heterodimer di dalam nukleus akan berikatan dengan DNA spesifik dan mengaktivasi transkripsi sitokin pada respon imun

dan inflamasi (Dutta, Fan, *et al*, 2006; Perkins, 2007). Peningkatan ikatan DNA dari NF- B ditunjukkan pada sindrom nefrotik kelainan minimal yang kambuh, dengan ditemukan adanya hubungan positif antara derajat proteinuria dan kenaikan ikatan DNA (Sahali, 2001).

Heterodimer subunit p65/p50 adalah bentuk NF- B yang tersering muncul pada sindrom nefrotik dibandingkan dengan subunit p50/50 (Hernandez, 1999; Mezzano, 2001). Sampai saat ini hanya ada sedikit penelitian tentang subunit p65 pada sindrom nefrotik dan terbatas pada ekspresinya saja atau aktivasinya saja yang berhubungan dengan resistensi steroid (Schachter, *et al.*, 2000; Sahali, 2001; Aviles, 2004; Hong-Yang, 2005).

Belum adanya laporan tentang hubungan antara ekspresi dan aktivasi subunit p65 NF- B pada sindrom nefrotik idiopatik, menyebabkan dorongan untuk dilakukan penelitian peran ekspresi dan aktivasi faktor transkripsi subunit p65 NF- B pada sindrom nefrotik resisten steroid pada anak .

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ada perbedaan ekspresi dan aktivasi subunit p65 NF- B pada sindrom nefrotik resisten steroid dibandingkan dengan sindrom nefrotik sensitif steroid dan melihat apakah ada korelasi di antara keduanya

1.2.1 Sub masalah

1. Apakah ekspresi subunit p65 NF- B pada sindrom nefrotik resisten steroid lebih rendah dibandingkan pada sindrom nefrotik sensitif steroid.
2. Apakah aktivasi subunit p65 NF- B pada sindrom nefrotik resisten steroid lebih tinggi dibandingkan pada sindrom nefrotik sensitif steroid .
3. Apakah terdapat korelasi antara ekspresi dan aktivasi subunit p65 NF- B pada sindrom nefrotik resisten steroid.

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan adanya perbedaan ekspresi dan aktivasi subunit p65 NF- B pada sindrom nefrotik resisten steroid dibandingkan dengan sindrom nefrotik sensitif steroid dan melihat apakah ada korelasi di antara keduanya.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan ekspresi subunit p65 NF B pada pasien sindrom nefrotik resisten steroid lebih rendah dibandingkan dengan sindrom nefrotik sensitif steroid pada anak.
2. Membuktikan aktivasi subunit p65 NF B pada pasien sindrom nefrotik resisten steroid lebih tinggi dibandingkan dengan sindrom nefrotik sensitif steroid pada anak.
3. Membuktikan korelasi antara penurunan ekspresi dan peningkatan aktivasi subunit p65 NF B pada pasien sindrom nefrotik resisten steroid.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat di Bidang Ilmiah dan Penelitian

1. Menjelaskan patogenesis terjadinya sindrom nefrotik resisten steroid
2. Mencari jalur (*pathway*) baru dalam mekanisme resistensi terhadap respon steroid pada sindrom nefrotik
3. Menjelaskan hubungan antara subunit p65 NF- B dengan respon pengobatan kortikosteroid pada sindrom nefrotik idiopatik yang berkaitan dengan mekanisme biomolekuler

1.4.2 Manfaat untuk Pasien

1. Memberikan harapan dikembangkan penatalaksanaan sindrom nefrotik resisten steroid pada anak.
2. Mendorong pengembangan terapi sindrom nefrotik resisten steroid

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Definisi dan Klasifikasi Sindrom Nefrotik

Sindrom nefrotik merupakan glomerulopati primer yang tersering ditemukan pada anak. Walaupun penyakit ini telah dikenal sejak hampir 1 abad yang lalu, namun sampai saat ini patogenesisnya masih belum jelas sehingga sampai saat ini tata laksana sindrom nefrotik pada sebagian kasus masih bermasalah (UKK Nefrologi, 2008).

Sindrom nefrotik adalah suatu sindrom klinik dengan gejala : (1) Proteinuria masif ($> 40 \text{ mg/m}^2 \text{ LPB/jam}$ atau rasio protein/kreatinin pada urin sewaktu $> 2 \text{ mg/mg}$ atau dipstik $2+$); (2) Hipoalbuminemia $< 2,5 \text{ g/dL}$; (3) Edema; (4) Dapat disertai hiperkolesterolemia (UKK Nefrologi, 2008).

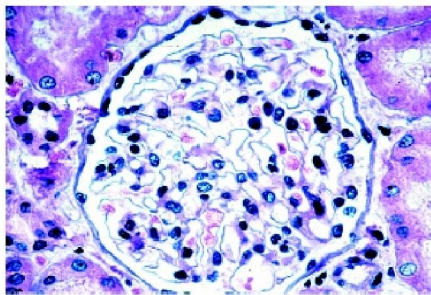
Insidens sindrom nefrotik pada anak dalam kepustakaan di Amerika Serikat dan Inggris adalah 2-4 kasus baru per 100.000 anak per tahun. Di negara berkembang insidennya lebih tinggi. Di Indonesia dilaporkan 6 kasus per 100.000 anak per tahun. Perbandingan anak laki-laki dan perempuan sebesar 2:1 (Orth & Ritz, 1998; UKK Nefrologi, 2008).

Berdasarkan etiologinya sindrom nefrotik dibagi 3 yaitu kongenital, primer/idiopatik, dan sekunder mengikuti penyakit sistemik, antara lain lupus eritematosus sistemik (LES), purpura Henoch Schonlein, dan lain-lain (UKK Nefrologi, 2008).

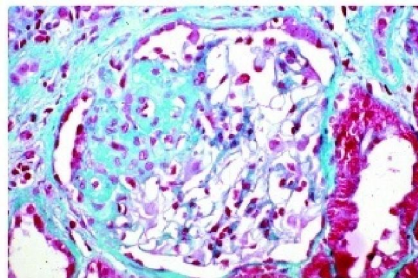
Sindrom nefrotik idiopatik pada anak, sebagian besar (80-90%) mempunyai gambaran patologi anatomi berupa kelainan minimal (SNKM). Gambaran patologi anatomi lainnya adalah glomerulosklerosis fokal segmental (GSFS) 7-8%, glomerulonefritis membranoproliferatif (GNMP)

6,2% mesangial proliferaatif difus (MPD) 1,9-2,3%, dan nefropati membranosa (GNM) 1,3%. Pada pengobatan kortikosteroid inisial, sebagian besar SNKM (94%) mengalami remisi total (responsif), sedangkan pada GSFS 80-85% tidak responsif (resisten steroid) (Bagga & Mantan, 2005; UKK Nefrologi, 2008).

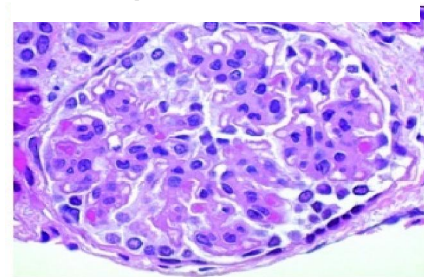
Kelainan Minimal



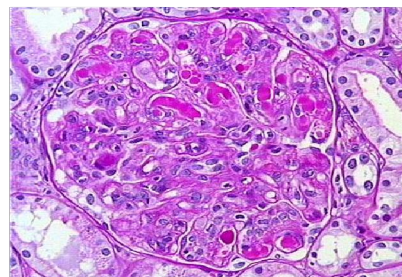
Glomerulosklerosis Fokal Segmental



Nefropati Membranosa



Glomerulonefritis Membrano Proliferaatif



Gambar 2.1. Gambaran histopatologi pada sindrom nefrotik idiopatik
Dikutip dari : Eddy & Symons, 2003.

Prognosis jangka panjang SNKM selama pengamatan 20 tahun menunjukkan hanya 4-5% menjadi gagal ginjal terminal, sedangkan pada GSFS 25% menjadi gagal ginjal terminal dalam 5 tahun, dan pada sebagian besar lainnya disertai penurunan fungsi ginjal. Pada berbagai penelitian jangka panjang ternyata respons terhadap pengobatan steroid lebih sering dipakai untuk menentukan prognosis dibandingkan dengan gambaran

patologi anatomi. Oleh karena itu pada saat ini klasifikasi sindrom nefrotik lebih didasarkan pada respons klinik yaitu: 1. Sindrom nefrotik sensitif steroid (SNS), 2. Sindrom nefrotik resisten steroid (SNRS) (UKK Nefrologi, 2008)

2.2 Patogenesis Sindrom Nefrotik

2.2.1 Aspek Anatomis

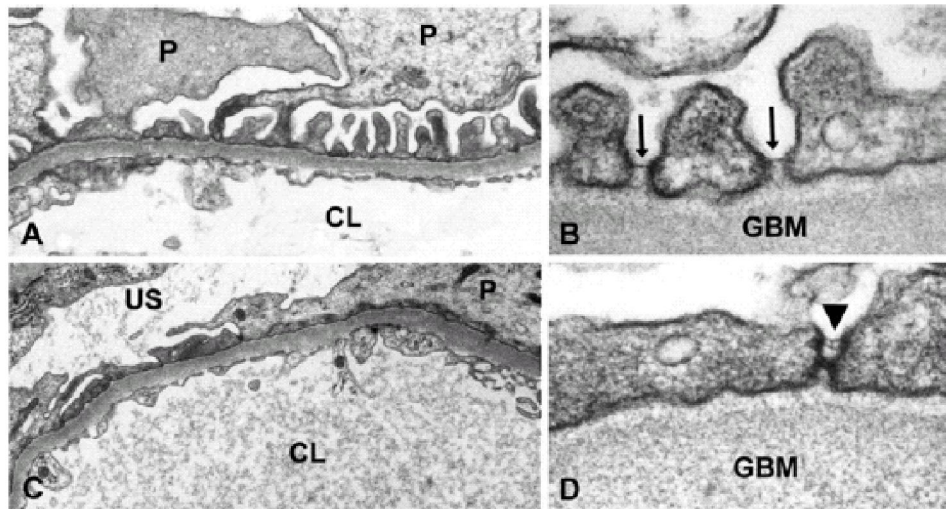
Dilaporkan bahwa ada 3 hal penting yang diidentifikasi berhubungan dengan patogenesis sindrom nefrotik, yaitu (1) perubahan permeabilitas glomerulus oleh faktor plasma, (2) adanya mutasi pada beberapa protein podosit, dan (3) perubahan respon limfosit-T (Eddy & Symon, 2003).

Pada awalnya perhatian penelitian difokuskan pada membran dasar atau faktor ekstraglomerulus yang menyebabkan terjadinya peningkatan permeabilitas glomerulus. Kemudian didapatkan bukti bahwa kerusakan pertama sindrom nefrotik idiopatik terjadi pada podosit, sel epitel visceral glomerulus, sehingga terjadi proteinuria (Valanciute *et al*, 2001; Gimbert, 2003).

Dinding kapiler glomerulus mempunyai 3 lapisan utama : (1) endotelium kapiler yang didapatkan banyak lubang disebut fenestra, (2) membran basal glomerulus yang membentuk suatu lapisan yang berkesinambungan, dan (3) lapisan sel epitel glomerulus (podosit) yang berhubungan satu dengan yang lain melalui suatu membran yang disebut *slit diaphragm* dan mengelilingi permukaan luar kapiler (Houllthofer, 2007). Lapisan-

lapisan ini membentuk sawar filtrasi yang bersifat selektif dalam menentukan molekul yang akan difiltrasi, berdasarkan ukuran dan muatan molekulnya. Secara normal, protein albumin (69 kd) tidak bisa melewati sawar filtrasi glomerulus (Eddy & Symon, 2003). Dengan menggunakan mikroskop elektron, pada sindrom nefrotik sering didapatkan perubahan arsitektur podosit, yaitu *slit diaphragm* hilangnya dan pendataran *foot processes* podosit yang disebut sebagai proses *transdifferentiation* (Pavenstadt, 2003).

Mekanisme pasti yang mendasari pendataran *foot processes* podosit dan hubungannya dengan proteinuria masih belum jelas. Proteinuria dapat disebabkan oleh beberapa tipe kerusakan podosit, termasuk faktor intrinsik dan ekstrinsik (Pavenstadt, 2003).



Gambar 2.2 . Gambaran mikroskop elektron pada dinding kapiler glomerulus normal dan sindrom nefrotik.

Dinding kapiler glomerulus normal (**A** dan **B**), dan sindrom nefrotik (**C** dan **D**). Badan sel podosit (**P**) meluas sampai *urinary space* (**US**), *foot processes* menempel pada membran basal glomerulus (**GMB**). (**B**) *Foot processes* tertata pada pola yang berhubungan satu dengan yang lain melalui *slit diaphragm* (**panah kecil**). (**D**) pada sindrom nefrotik, *slit diaphragm* menghilang dan pendataran *foot processes* podosit (**panah besar**).

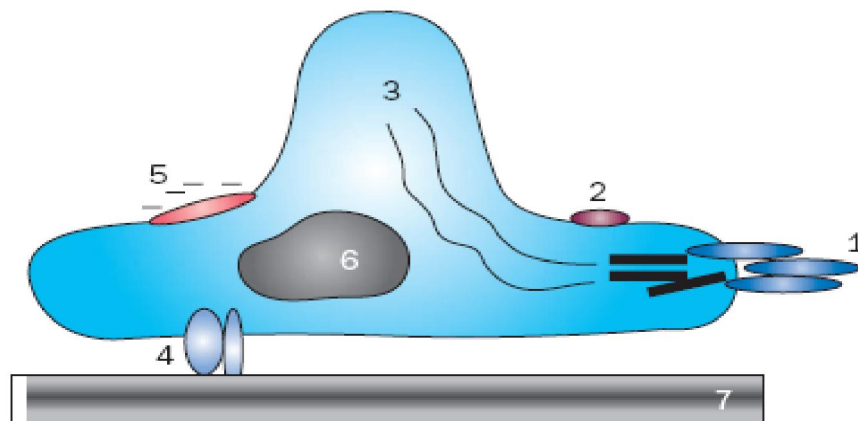
Dikutip dari : Van den Berg & Weening, 2004.

2.2.2 Aspek Genetik

Podocin (NPHS2) adalah protein 24-KDa dengan 383 asam amino yang berlokasi pada *slit diaphragm* dan berinteraksi langsung dengan *nephrin* (NPHS1) dan *CD2-associated protein*. *Nephrin* dan podocin merupakan komponen kunci *slit diaphragm* dari sel epitel glomerulus dan berperan penting pada fungsi normal *barrier* filtrasi glomerulus. Defek pada podocin merubah permeabilitas *slit diaphragm* dan juga mempengaruhi pemrosesan dan lokalisasi *nephrin*. Banyak kelainan ginjal yang diduga disebabkan mutasi pada gen podocin yang telah diidentifikasi. Penyakit yang terkait secara genetik pada mutasi ini tampak pada 50% keluarga dengan SNRS dan transmisi autosomal resesif. Pada kasus *sporadic steroid-resistant*, mutasi terjadi pada 10% sampai 30% kasus. Pasien dengan mutasi podocin menunjukkan variabilitas yang besar pada derajat keparahan penyakitnya sehingga diduga bahwa terdapat hal lain yang penting dalam modulasi penyakit ini, baik genetik maupun non genetik. Diduga terdapat korelasi antara tipe mutasi dan keparahan fenotip. *Mutation detection rate* NPHS2 sebesar 24.7% untuk semua kasus, 29.2% untuk familial dan 24%

untuk kasus *sporadic SRNS*. Mutasi tersering pada exon 5 dan munculnya mutasi pada exon 4 ditemukan meningkat pada risiko *end-stage renal disease*.(Otukesh, *et al*, 2009)

Dilaporkan adanya mutasi gen penyandi *Nephrin* (NPHS₁), *CD2AP* (*CD2 associated protein*), *Podocin* (NPHS₂), *Wilm's Tumor* (WT1), *Transcient receptor potential-6* (TRCP-6), *Apha actinin-4* (ACTN-4), atau *Laminin -2 chain* (LAMB-2) pada pasien sindrom nefrotik yang berat, yang berlanjut menjadi gagal ginjal terminal (Niaudet, 2004). Pada pasien dengan sindrom nefrotik kongenital didapatkan adanya mutasi pada salah satu gen tersebut diatas.



Gambar 2.3. Mutasi protein podosit.

1: protein *slit diaphragm* (*nephrin*), 2: protein membran (*podocin*), 3: sitoskeleton (*actinin- 4 CD2AP*), 4: molekul adhesi matrix ekstraselular (*4 integrin*), 5: protein *sialylated anionic surface*, 6: protein nuklear (*WT1, LMX1B, SMARCAL1*), 7: protein membran basal (*5 collagen IV*)

Dikutip dari : Eddy dan Simon, 2003.

Gen NPHS1 berada pada kromosom 19q13. merupakan gen yang pertama kali dilaporkan sebagai penyebab sindrom nefrotik, gen mengkode protein 136kDa yang dinamakan *nephrin*.

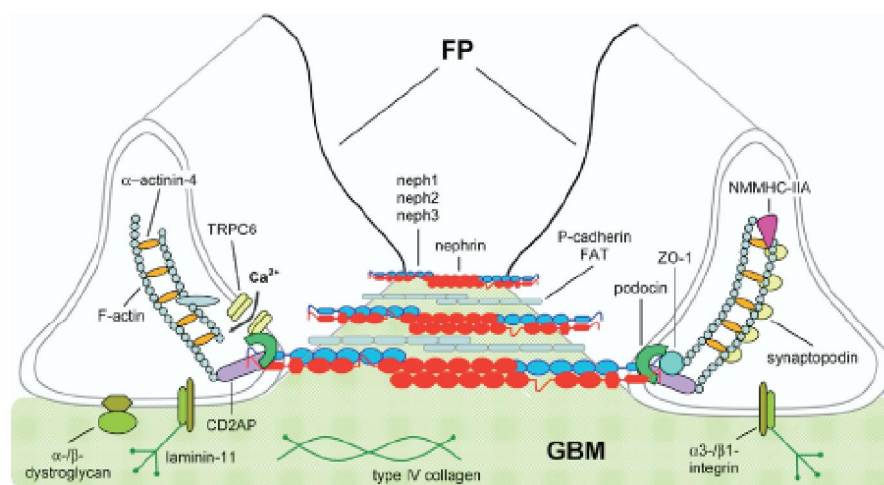
Nephrin (NPHS1) merupakan protein pada *slit diaphragm*, adanya mutasi pada nephrin dapat menyebabkan terjadinya sindrom nefrotik kongenital tipe *Finnish* (CNF). CNF adalah salah satu bentuk nephrosis yang terjadi pada neonates atau prenatal. Ditandai dengan adanya gambaran glomerulus mikro-kistik, *progressive glomerular sclerosis*, dan pendataran *foot processes* yang luas. (Doublier 2001; Vatz, 2005).

Gen *CD2 associated protein* (CD2AP) berlokasi pada kromosom 6p12 dan mengkode protein *domain* 80 kDa SH3, merupakan suatu protein yang menstabilisasi hubungan antara sel T dengan *antigen presenting cell* (APC). CD2AP terutama diekspresi podosit pada permukaan sitoplasma *slit diaphragm* (Vatz, 2005). Beberapa penelitian melaporkan bahwa CD2AP berinteraksi dengan *nephrin*, keduanya diperlukan pada *signaling* intraselular (Benzing, 2004).

Gen NPHS2 berada pada kromosom 1q25-q31, gen NPHS2 merupakan gen penyandi protein asam amino 383 yang disebut sebagai podocin. Podocin mempunyai berat molekul 42kDa, memegang peranan penting untuk pengaturan struktur membran glomerulus (Caridi, 2005). Pada pasien sindrom nefrotik yang mengalami mutasi pada gen NPHS2, terjadi pula mutasi pada *podocin* dan pasien tersebut mengalami resistensi terhadap terapi steroid (Niaudet., 2004).

Spektrum klinis mutasi NPHS₂ sangat luas, mutasi gen podocin bisa terjadi sejak lahir, masa anak-anak, atau saat

dewasa. Ditemukan 10-30% mutasi *podocin* pada pasien SNRS dengan FSGS (McKenzie, 2007). Pada penelitian secara kohort dilaporkan bahwa risiko kekambuhan pada pasien SN yang telah dilakukan transplantasi ginjal dengan mutasi podocin adalah rendah (Billing, 2004).



Gambar 2.4. Anatomi molekular *foot processes* podosit.
Dikutip dari : Moller, 2006.

Gen *Wilm's tumor* (WT1) didapatkan pada kromosom 11p13, terdiri dari 10 exon mengkode protein yang mempunyai empat *zinc finger*. Mutasi WT1 dapat terjadi pada *sporadic Wilms tumor* yang berkaitan dengan sindrom *Frasier* dan *Denys-Drash*. Kedua sindrom tersebut ditandai dengan adanya disfungsi gonad, *progressive nephropathy*, GSFS, atau *diffuse mesangial sclerosis*, terjadi pada anak usia dini (Vatz, 2005; Moller, 2006).

Gen *Transient receptor potential 6* (TRPC6) dilaporkan berhubungan dengan sindrom nefrotik (GSFS), berlokasi pada kromosom 11q24. *TRPC6* merupakan bagian dari superfamili

transient receptor potential (TRP). Mutasi gen TRPC6 didapatkan pada GSFS autosomal dominan (Vatz, 2005).

Alpha actinin 4 (ACTN4) merupakan komponen sitoskeleton actin yang berikatan dengan *F actin* dan gen, didapatkan pada kromosom 19q13. Mutasi ACTN4 dapat terjadi pada GSFS. ACTN4 terutama diekspresi pada podosit glomerulus (Vatz 2005; Moller, 2006).

Laminin 2 chain (LAMB2) diekspresikan pada arteri membran basal glomerulus, kapsul lensa mata, retina , dan sinaps neuromuskular. Mutasi gen LAMB2 dapat menyebabkan sindrom *Pierson*, sindrom nefrotik kongenital autosomal resesif, ditandai dengan adanya kelainan pada mata dan gambaran histopatologis *diffuse mesangial sclerosis* (Obeidova, 2006)

Sindrom nefrotik autosomal resesif tipe 3 (NPHS3) disebabkan oleh mutasi gen *PLCE1 phospholipase*, berkaitan dengan adanya disfungsi struktur podosit (Hinkes, 2008).

2.2.3 Aspek Immunologik

Sindrom nefrotik kelainan minimal (SNKM) merupakan suatu akibat dari gangguan fungsi limfosit dengan peningkatan level faktor permeabilitas yang diperantarai limfosit. Hipotesis ini berdasarkan beberapa observasi klinis yang menduga adanya keterlibatan sistem imun dalam patogenesis terjadinya sindrom nefrotik idiopatik (Aviles, 2004).

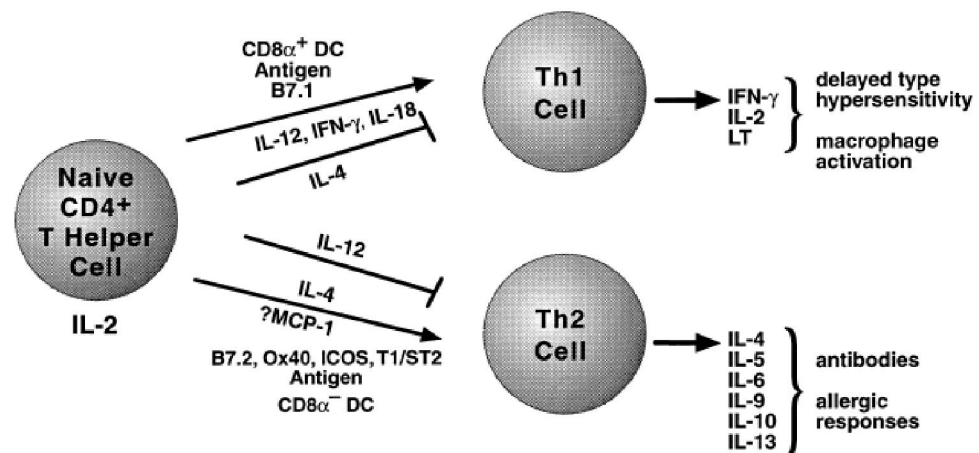
Disebutkan bahwa sindrom nefrotik idiopatik berhubungan dengan abnormalitas sistem imun, yaitu respon abnormal limfosit terhadap mitogen, disfungsi limfosit T *suppressor*, perubahan sintesis immunoglobulin dan abnormal fungsi sel T dalam mengatur sel B (Zahwieja, 2002). Bukti yang mendasari hal tersebut diatas antara lain obat-obatan yang efektif untuk pengobatan sindrom nefrotik mempunyai efek pada sistem imun, dan meningkatnya insiden atopi pada anak dengan sindrom nefrotik. Pada sindrom nefrotik pada anak seringkali didapatkan adanya komplikasi peritonitis atau sepsis, remisi dapat disebabkan oleh karena penekanan pada sel T dan adanya hubungan antara SNKM dengan penyakit *Hodgkin* atau limfoma yang lain (Van den Berg & Weening, 2004).

Aktivasi sel T *helper* CD4 (Th) dapat dikelompokkan menjadi dua berdasarkan fungsi subset, yaitu Th tipe 1 (Th1) dan Th tipe 2 (Th2). Polarisasi Th0 menjadi Th1 dan Th2 melibatkan mekanisme yang berbeda, dimana sitokin memegang peranan yang penting. Interferon γ dan (IFN- γ) dan IL-12 sebagai mediator Th 1. Sedangkan IL-4 merangsang pembentukan Th2 dari sel T *naive*. Th1 mengekspresikan reseptor IL-12, IFN- γ , TNF- α , dan *limfotoksin*- α (LT- α) (dikenal sebagai TNF- β). Sitokin yang dihasilkan Th1 menginisiasi reaksi inflamasi, memperkuat respon imun sel dan memperantai hipersensitivitas tipe lambat. Sel Th2 mensintesis IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 dan IL-13 yang bersama-sama memegang peranan dalam respon antiinflamasi, membantu

sel B untuk memproduksi antibodi dan melindungi terhadap patogen ekstraselular (Cunard & Kelly, 2002; Gimbert, 2003).

Paparan antigen terhadap limfosit T menimbulkan polarisasi respon imun, yaitu tipe 1 (interferon- γ , IL-2) atau tipe 2 (IL-4, IL-10, atau IL-13). Sitokin tipe 1 terutama pada imunitas seluler dan sitokin tipe 2 pada beberapa imunitas humoral. Sitokin tipe 2 terutama berhubungan dengan atopi dan *switching* sel B yang menghasilkan IgG4 dan IgE. Mekanisme yang tepat tentang bias sitokin yang dapat mempengaruhi permeabilitas glomerulus masih belum jelas (Van den Berg & Weening, 2004).

Aktivasi sel T pada langkah awal respon imun tergantung dari interaksi dengan sel dendritik melalui permukaan reseptor sel. Selama fase nefrotik peningkatan sel T CD4 dan CD8 dapat ditentukan dengan menggunakan pemeriksaan imunofenotiping dari limfosit perifer (Gimbert, 2003; Van den Berg & Weening, 2004).



Gambar 2.5. Jalur Diferensiasi T Helper (Th).
Dikutip dari : Gimbert, 2003.

Penelitian pada penderita sindrom nefrotik relaps, menggunakan isolasi *subtractive cloning Th2*, didapatkan bukti adanya *c-maf* (*musculoaponeurotic fibrosarcoma*) yang mempengaruhi terjadinya relaps (Sahali *et al.*, 2002). Akhir-akhir ini, dilaporkan adanya aktifitas abnormal faktor transkripsi pada SNKM. Disamping itu, juga didapatkan peningkatan aktivasi sel T CD4 selama relaps.

Dilaporkan bahwa pada sindrom nefrotik relaps didapatkan aktivasi NF- B dalam sel T CD4+. NF- B diaktivasi secara cepat oleh beragam variasi sinyal patogenik seperti virus dan bakteri, sel T dan mitogen sel B, sitokin TNF- dan TNF- , serta stress oksidatif. Aktivasi transkripsional NF- B diregulasi oleh protein inhibitor (I- B), dimana I- B bertindak sebagai inhibitor yang paling penting (Gimbert, 2003).

2.3 Nuclear Factor Kappa B (NF- B)

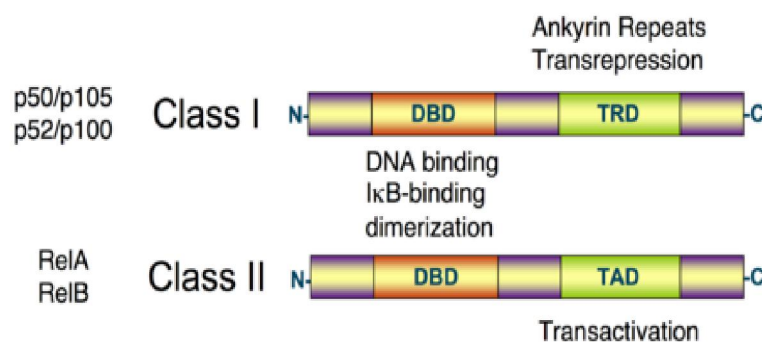
Lebih dari 10 tahun yang lalu faktor transkripsi NF B dan AP1 pertama kali ditemukan peran pentingnya dalam menginduksi gen yang terlibat dalam inflamasi, juga terbukti keterlibatannya dalam penyakit yang melibatkan aktivasi kronis sistem imun, termasuk asma, aterosklerosis, *inflammatory bowel disease*, dan penyakit autoimun seperti *multiple sclerosis* dan *rheumatoid arthritis* (Baldwin, 2001; Lama, *et al*, 2002).

Gen-gen yang mengatur sintesis sitokin, reseptor sitokin, protein kemotaktik, atau molekul adhesi seperti *Tumor Necrosis Factor* (TNF), *Interleukin-1* (IL-1), *Interleukin-2* (IL-2), *Interleukin-6* (IL-6), *Interleukin-8* (IL-8), *macrophage chemotactic protein* (MCP-1), *regulated on activation normal T cell expressed and secreted* (RANTES), *interferon-* (IFN)-, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), *vascular cellular adhesion molecule-1* (VCAM-1), dan *E-selectin*, mengandung NF- B dan/atau lokasi AP-1 di area promoternya atau area pengaturnya. Sehingga, kedua faktor transkripsi tersebut signifikan sebagai target yang jelas untuk terapi immunosupresif. *Glucocorticoids* (GCs) dan katekolamin, hormon stres utama, serta produksi sitokin proinflamatori seperti IL-12, IL-6, dan TNF-, menstimulasi produksi sitokin antiinflamasi seperti IL-10, IL-4, dan TGF-. Secara sistematis, melalui aktivasi sistem stres, respon imun yang berlebihan menstimulasi mekanisme *negative feedback* yang penting, yang melindungi organisme dari sitokin proinflamatori yang berlebihan dan produk kerusakan jaringan yang berlebihan (Zachwieja, *et al*, 2002).

Nuclear factor kappa B (NF- B) merupakan faktor transkripsi respon cepat pada stres lingkungan, cedera, radang, atau reaksi imunologis. Aktivasi NF- B mengarah pada kontrol gen untuk ekspresi sitokin dan kemokin, immunoreseptor, *cell adhesion molecules*, *growth factors*, atau protein fase akut. Jadi, secara langsung maupun tidak langsung NF- B mengontrol variasi yang luas dari respon biologis, khususnya bagian dari imunitas didapat dan adaptif. (Grimbert, *et al*, 2003)

2.3.1 Struktur dan Fungsi NF- B

Nuclear factor kappa B (NF- B) ditemukan oleh Send dan Baltimore (1986) pada sel B *mature* sebagai faktor transkripsi nuklear, yang terikat pada elemen dalam *-immunoglobulin light enhancer*. NF- B terdapat pada sebagian besar sel dan terdiri dari dua subunit yaitu 50kDa dan 65kDa yang terikat pada *protein inhibitor* yang diberi nama I B, p65 merupakan RelA. Semua anggota keluarga *NF- B/Rel family* mengandung *N-terminal Rel-homology-domain* (RHD) yang bertanggung jawab terhadap ikatan dengan DNA, dimerisasi, translokasi nuklear, interaksi dengan *protein inhibitor* (I Bs) dan regulasi transkripsi. Terdapat 2 kelas struktur protein NF- B protein (gambar 2.6): kelas I dan kelas II. Kedua kelas mengandung *N-terminal DNA-binding domain* (DBD), yang juga bertindak sebagai penghubung dimerisasi pada faktor transkripsi NF- B lain dan juga berikatan dengan protein inhibitor I B . *C-terminus* dari protein kelas 1 mengandung sejumlah *ankyrin repeats* dan memiliki aktivitas *transrepression*. *C-terminus* dari protein kelas II memiliki peran *transactivation*. p65 (RelA), c-Rel dan RelB dapat secara langsung mengalami transkripsi aktif melalui interaksi dengan *transactivation domains* (TAD) yang berada pada C-terminus dengan bermacam komponen *basal transcription machinery* (Send & Baltimore, 1986).



Gambar 2.6. Skema diagram struktur protein NF- B
Dikutip dari Baldwin, 2001.

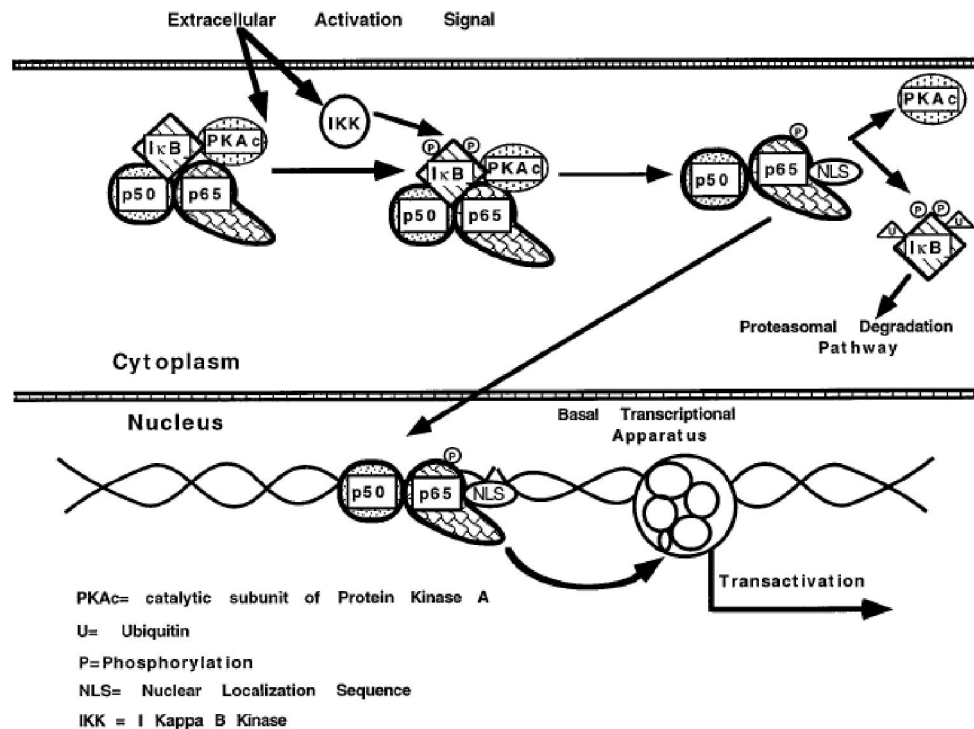
2.3.2 Mekanisme Aktivasi NF- B

Heterodimer-heterodimer NF- B yang inaktif berada di dalam sitoplasma. NF- B sitoplasma dihubungkan dengan *catalytic subunit of protein kinase A* (PKAc). Apabila terjadi respon terhadap sinyal aktivasi, I B kinase (IKK) memfosforilasi I B, dan mengarahkannya untuk melakukan ubiquitinasi dan degradasi melalui proteasome, pada saat yang sama PKAc memfosforilasi p65 subunit NF- B. Proses aktivasi ini membuat p65 subunit NF- B terpapar pada sinyal lokalisasi nuklear, sehingga heterodimer NF- B aktif untuk pindah ke nukleus sel yang kemudian berinteraksi dengan elemen B-responsive pada kromatin dan gen yang memodulasi transkripsi (Mc.Kay, 1999). Sebagai gantinya, I B mengalami resintesis dengan cepat dan mensekuestrasi NFkB di sitoplasma dan dengan demikian menghentikan aktivitas NFkB. (Das, *et al.*, 2001) (Gambar 2.7).

Aktivasi NF- B diawali oleh sinyal yang menginduksi degradasi protein I B melalui aktivasi kinase yang disebut *I B kinase* (IKK). IKK terdiri dari heterodimer dari catalytic subunit IKK alpha dan IKK beta dan *master* protein pengatur yang disebut NEMO (*NF-kappa B essential modulator*) atau IKK *gamma*. Ketika diaktivasi oleh sinyal dari luar sel, I B kinase memfosforilasi dua residu *serine* yang berlokasi pada *I B regulatory domain*. Fosforilasi pada *serine* (contohnya *serine* 32 dan 36 pada I B manusia), menyebabkan

molekul I B dimodifikasi melalui proses yang disebut ubiquinasi, sehingga I B terdegradasi oleh struktur sel proteasom. Melalui degradasi I B, kompleks NF- B kemudian secara bebas memasuki nukleus sehingga dapat 'menghidupkan' ekspresi gen spesifik yang memiliki *DNA-binding sites* NF- B di dekatnya. Aktivasi gen-gen ini oleh NF- B menyebabkan respon fisiologis, seperti respon inflamatori atau respon imun, respon pertahanan sel, atau proliferasi selular. NF- B 'menghidupkan' ekspresi represornya sendiri yaitu I B , sehingga mengadakan hambatan ulang pada NF- B dan, akhirnya membentuk *auto feedback loop*, yang menghasilkan level yang berfluktuasi dari aktivasi NF- B (Cao, 2001).

Nuclear factor kappa B (NF- B) yang bertranslokasi ke dalam nukleus dan akan terikat pada *specific sequences DNA* yang disebut *response elements* (RE). *DNA/NF- B complex* kemudian merekrut protein-protein lain seperti *coactivators* dan *RNA polymerase*, mengakibatkan *downstream DNA* ke dalam mRNA, dan pada saat yang bersamaan ditranslasikan ke dalam protein, menghasilkan perubahan fungsi sel (Ray & Prefontaine, 1994).



Gambar 2.7. Mekanisme umum aktivasi NF- B.
 Dikutip dari McKay & Cidlowski JA, 1999

2.3.3 Hubungan Aktivasi NF- B dan Sindrom Nefrotik

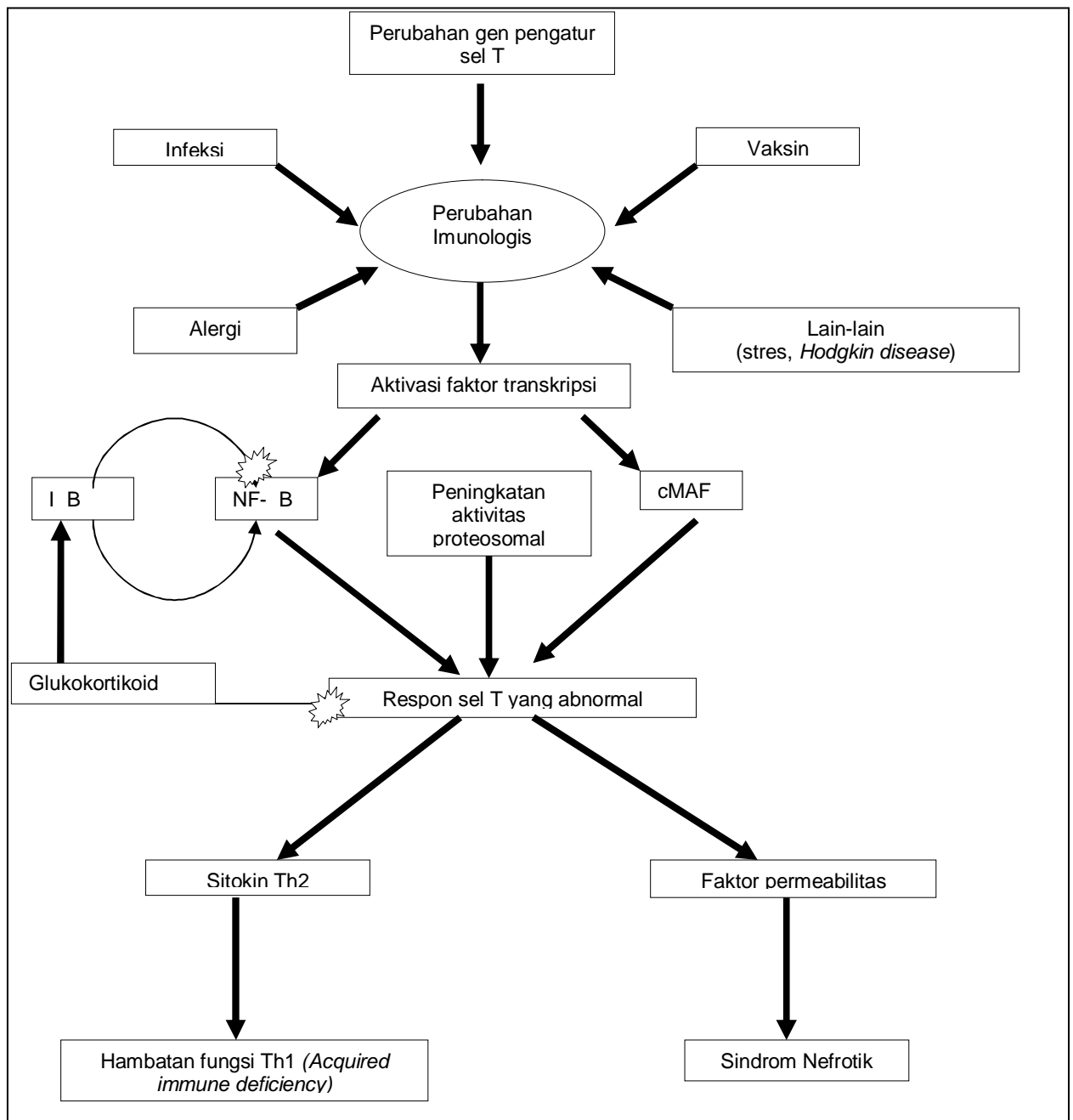
Dilaporkan adanya peningkatan aktivasi NF- B pada sel-sel CD4+ T selama relaps sindrom nefrotik (Grimbert P, *et al.*, 2003). *Nuclear factor kappa B* (NF- B) terlibat pada aktivasi transkripsi dari sejumlah besar gen-gen termasuk yang mengkode IL-1, IL-6, IL-2, IL-8, TNF- dan LT- , yang terlihat meningkat pada SNKM relaps. Salah satu penelitian menunjukkan dua elemen NFkB (p50 dan p65) bertanggung jawab pada IL-13 promoter, oleh karena itu sitokin-sitokin tersebut dimasukkan dalam target kerja NFkB. Aktivasi transkripsional NFkB diregulasi dengan ketat oleh protein inhibitor IκB, dimana IκB difosforilasi dengan cepat, kemudian didegradasi oleh proteasom, sehingga menyebabkan translokasi nuklear NFkB, yang mengaktivasi gen target, termasuk inhibitorynya, *Inhibitor- B* (I B). Sebagai gantinya, I B

mengalami resintesis dengan cepat dan mensekuestrasi NF- B di sitoplasma dan dengan demikian menghentikan aktivitas NF- B (Das *et al.*, 2001). Hasil penelitian pada 3 pasien dengan resisten steroid tapi sensitif terhadap siklosporin, didapatkan peningkatan aktivasi NF- B yang hebat selama terapi steroid saja, dan hilangnya aktivasi tersebut setelah ditambahkan siklosporin. Putusnya *NF- B autoregulatory loop* selama relaps dan pada resisten steroid, tidak berkaitan dengan perubahan genetik I B , karena ditemukannya peningkatan level inhibitor selama remisi. Tidak terdeteksi terjadinya mutasi atau delesi pada promotor I B pada tujuh pasien yang dianalisa (Grimbert *et al.*, 2003).

Mekanisme glukokortikoid dan siklosporin menginduksi remisi pada SNKM mungkin bukan hanya sederhana tetapi lebih kompleks. Hipotesis ini berdasar pada penelitian eksperimental yang menunjukkan bahwa aktivasi NF- B pada PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*) dan sel-sel T dari SNKM relaps, dihambat pada penambahan *ex vivo proteasomal inhibitor MG132*, yang menghambat degradasi fosforilasi dari I B . Siklosporin A memiliki efek yang serupa dengan MG132. Glukokortikoid menginduksi transaktivasi gen I B , yang mungkin memiliki kontribusi pada peningkatan ekspresi I B selama remisi dan hal ini paling banyak tampak pada pasien yang mendapat terapi steroid. Glucocorticoid dan siklosporin bertindak melalui mekanisme stabilisasi I B dan hambatan aktivasi NF- B.

Gambaran konsep yang mudah untuk menggambarkan peran NF- B tampak pada Gambar 2.8. (Grimbert *et al.*, 2003). Infeksi, alergen, vaksin, perubahan gen-gen pengatur T sel dan hal-hal lain seperti (stres dan penyakit Hodgkin) menyebabkan suatu *immunological challenge*, yang selanjutnya

mengaktivasi faktor transkripsi *Nuclear Factor B* (NF- B) dan c-Maf. Kedua faktor transkripsi ini menyebabkan suatu respon sel T yang abnormal. Respon abnormal tersebut meningkatkan sitokin Th2 sehingga menekan fungsi dari Th1 dan dapat menimbulkan suatu respon yang abnormal dari faktor permeabilitas ginjal sehingga terjadi sindrom nefrotik (Gimbert, *et.al.*, 2003).



Gambar 2.8. Urutan peristiwa yang mengarah pada respon sel T yang abnormal pada sindrom nefrotik : c-Maf = *musculoaponeurotic fibrosarcoma*, NF- B = *nuclear factor kappa B*, I B = *inhibitor kappa B*, Th1= *T helper 1*, Th2 = *T helper 2*
Dikutip dari Grimbert et al., 2003

2.4 Ekspresi Subunit p65 NF- B pada Sindrom Nefrotik

Pada penelitian dengan menggunakan bahan non radioaktif dalam lilin parafin yang ditanamkan pada jaringan ginjal pasien sindrom nefrotik, dibuktikan bahwa pada pasien sindrom nefrotik, aktivitas NF- B dan AP-1 terutama terdeteksi pada sel epitel kortikal tubulus dan, pada jumlah yang sangat kecil terdapat pada beberapa sel glomerulus (terutama pada podosit) (Hernandez, 1999).

Pada penelitian lain dibuktikan bahwa NF- B subunit p50 dan subunit p65 terutama ditemukan pada sel epitel tubular yaitu pada nukleus dan sitoplasma, tanpa ditemukan adanya perbedaan yang signifikan. Aktivasi NF- B dan AP1 yang berlebihan ditemukan pada tubulus pasien SNKNM, pada pasien SNKM sebaliknya tidak ditemukan aktivasi NF- B yang berlebihan, hal ini dapat menjelaskan adanya perbedaan transkripsi dari gen targetnya yang berhubungan signifikan dengan tingkat proteinuria. Hasil penelitian ini juga menyebutkan bahwa pasien SNKNM umumnya menunjukkan proses penyakit yang progresif, dan memiliki ekspresi yang berlebihan dari kemokin-kemokin MCP-1, RANTES, dan OPN dan *profibrogenic cytokines*, *platelet-derived growth factor-BB* (PDGF-BB) dan *Transforming Growth Factor-beta* (TGF-), pada sel epitel tubulus. Data-data tersebut mendukung teori yang menyebutkan bahwa peningkatan protein yang melalui sel tubulus dapat mengaktivasi NF- B. Konsekuensi peningkatan ekspresi tubular dari gen target ini berhubungan dengan infiltrasi sel interstitial dan kerusakan tubulus (Mezzano *et al.*, 2001).

Faktor transkripsi memiliki peran yang sangat penting dalam meregulasi ekspresi gen melalui kemampuan untuk berinteraksi dengan seri DNA yang unik untuk tiap faktor transkripsi pada daerah *promoter* dari gen yang berbeda. Faktor transkripsi tidak hanya memodulasi tingkat ekspresi gen, tetapi juga spesifitas

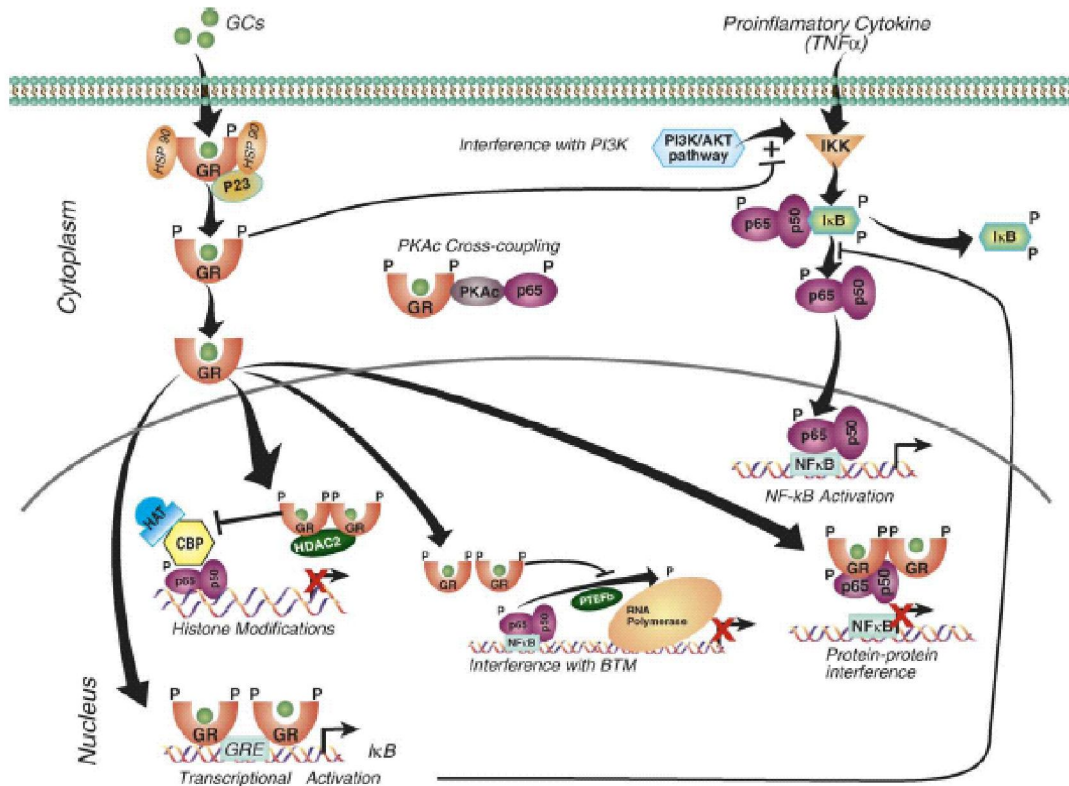
sinyal, yang menentukan kehadiran gen target spesifik. Sejumlah besar stimuli dapat mengaktifkan NF- B dan AP-1, meskipun yang mana yang sangat dibutuhkan untuk memicu ekspresi gen dari sitokin khusus masih belum diketahui. Lebih lanjut, periode waktu untuk aktivasi faktor transkripsi yang terikat dengan *DNA binding site* pada regio promotor gen tampaknya menjadi elemen kunci dalam memicu ekspresi gen spesifik. Aktivasi NF- B dan AP-1 dapat mengindikasikan bahwa sinyal pertama untuk mentranskripsi seri khusus dari gen telah ada, meskipun faktor transkripsi spesifik lain dibutuhkan untuk mengaktivasi transkripsi gen ini (Sahali, 2002).

Pada penelitian lain dibuktikan hilangnya kompleks p65/p50 heterodimer NF B pada sel T pasien SNRS sehingga hanya ada p50/p50 homodimer. Pada pasien dengan SNRS hanya terdapat antibodi anti-p50 dari ikatan berhubungan dengan p50/p50 dimers. Selain itu juga ditemukan penurunan protein NF- B p65 dan penurunan mRNA subunit p65 pada pasien SRNS, sementara ekspresi subunit p50 adalah sama pada pasien dengan SSNS maupun SRNS. Berkurangnya protein NF B p65 berhubungan dengan resistensi steroid. Peneliti ini juga menunjukkan bahwa sel-sel T baik pada pasien SRNS dan SSNS menunjukkan peningkatan ekspresi IL-2 pada saat relaps dibandingkan dengan kontrol normal (Aviles *et al.*, 2004). Penemuan ini konsisten dengan dua laporan terdahulu. Dilaporkan adanya peningkatan kadar IL-2 pada serum dari pasien anak dengan SSNS dan SRNS dengan menggunakan *flow cytometry* diketahui bahwa peningkatan IL-2 intraselular pada limfosit terjadi pada pasien SRNS relaps (Lama *et al.*, 2002; Zachwieja *et al.*, 2002). Hal ini dapat menjadi faktor kontributor dalam respon yang buruk pada steroid oral pada pasien dengan SRNS disebabkan ekspresi IL-2 berlebihan dapat menginduksi resistensi steroid pada limfosit. Kadar

yang tertinggi dari IL-2 ditemukan pada pasien dengan SRNS, di samping penurunan ekspresi *subunit p65* NF- B. Regulasi gen IL-2 adalah kompleks dan termasuk didalamnya peran faktor transkripsi seperti NF- B, *nuclear factor of activated T cells* (NFAT), *octamer 2* (OCT2), AP-1, dan *cAMP responsive element binding protein* (CREB), sangatlah mungkin jika absennya NF- B p65 mungkin berdampak pada produksi IL-2 (Ray, 1994; Grimbert *et al.*, 2003; Hodson, 2007).

Pada penelitian menggunakan sel-sel *Cos-1 transfected glucocorticoid receptor* dan dimer-dimer NF- B berbeda juga menunjukkan pentingnya subunit p65 pada transrepresi oleh reseptor glukokortikoid. Hanya sel-sel yang terdapat *heterodimer* p65/p50 atau homodimer 65 yang sensitif terhadap steroid. Sementara, sel-sel yang *transfected* hanya dengan homodimer p50 tidak berespon terhadap steroid. Absennya subunit p65 akan merusak kemampuan reseptor glukokortikoid untuk merepresi fungsi imun melalui hambatan aktivitas transkripsi NF- B, hal ini disebabkan keterlibatan fungsional glukokortikoid dengan NF- B diperantarai oleh interaksi dengan transaktivasi domain p65 (Ray, 2004). Akibat tidak adanya subunit p65 NF- B juga menghasilkan ketidakmampuan untuk mensupresi aktivasi NF- B melalui setidaknya tiga mekanisme potensial. Pertama, pencegahan interaksi fisik antara reseptor glukokortikoid dan NF- B dapat mengarah pada aktifitas NF- B yang tak terepresi. Kedua, *nuclear export* dari *dimer* NF- B aktif menjadi rusak, sehingga lebih banyak dimer yang tersedia untuk ikatan dengan DNA. Penelitian pada limfosit B oleh menunjukkan bahwa pada dimer NF- B yang hanya mengandung subunit p50 ditemukan adanya *nuclear eksport* yang tidak efisien ketika dibandingkan dengan dimer yang juga mengandung subunit p65. Ketiga, absennya p65 dapat menurunkan afinitas NF- B untuk *glucocorticoid-induced leucine zipper* (GILZ), yang normalnya menghambat

translokasi nuclear NF- B melalui ikatan pada subunit p65 (Tam *et al.*, pada Lama 2001).



Gambar 2.9. Represi sinyal NF- B yang diperantarai GR
Dikutip dari Smoak & Cidlowski JA, 2004

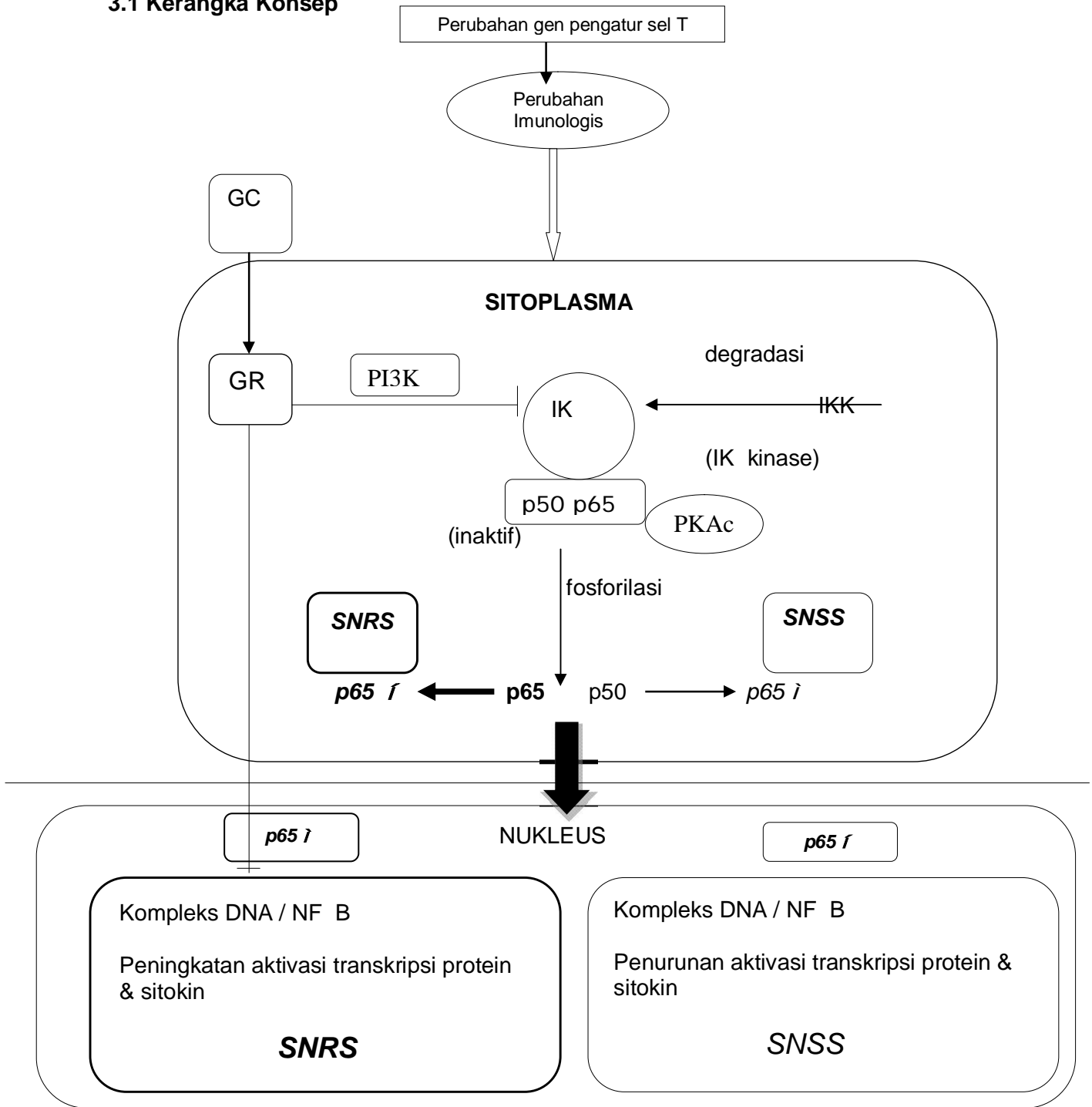
Glukortikoid dapat menghambat sinyal NF- B melalui beberapa jalur, yaitu di sitoplasma: a. GR menghambat melalui PI3K pathway sehingga memodulasi aktivitas IKK, b. GR dan p65 berkompetisi untuk berikatan dengan PKAc (saling menghambat). Sedangkan jika di nukleus: a. GR merekrut HDAC-2 pada kompleks p65 CBP HAT (model kompetisi kofaktor/modifikasi histon), b. GR menghambat melalui fosforilasi CTD dari *RNA polimerase II* sehingga mengganggu stimulasi transkripsi NF-KB (*interference with BTM*), c. represi transkripsi melalui interaksi langsung protein-protein

dengan p65 sehingga mencegah ikatan NF- B dengan DNA, d. melalui induksi IKB sehingga NF- B kembali ke sitoplasma (Gambar 2.9) (Smoak & Cidlowski, 2004).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Catatan:

Variabel yang hurufnya miring dan ditebalkan (***bold***) adalah variabel yang diteliti

Heterodimer NF- B (terdiri dari subunit p65 dan p50) yang inaktif berada di dalam sitoplasma. NF- B sitoplasma dihubungkan dengan *catalytic subunit of protein kinase A* (PKAc). Apabila terjadi respon terhadap sinyal aktivasi dari berbagai sebab misalnya akibat alergi, infeksi, perubahan gen pengatur sel T, vaksin, dan lain-lain yang mengakibatkan perubahan imunologis, sehingga I B kinase (IKK) memfosforilasi I B, dan mengarahkannya untuk melakukan ubiquitinasi dan degradasi melalui proteasome, pada saat yang sama PKAc memfosforilasi p65 subunit NF- B. Proses aktivasi ini membuat terpapar pada sinyal lokalisasi nuklear pada p65, sehingga heterodimer NF- B aktif untuk pindah ke nukleus sel yang kemudian berinteraksi dengan elemen B-responsive pada kromatin dan gen yang memodulasi transkripsi.

Glukokortikoid (GC) berikatan dengan GR di sitoplasma. Di sitoplasma: (a) GR menghambat melalui *phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway* berakibat modulasi aktivitas IKK, (b) GR dan p65 berkompetisi untuk berikatan dengan PKAc sehingga efek GR adalah menghambat p65. Di nukleus: (a) GR dan NF-kB bersaing untuk koaktivator SRC-1 (*steroid reseptor coaktivator-1*) dan CBP (*c-AMP response element-binding protein [CREB]-binding protein*) hal ini disebut juga sebagai kompetisi ikatan langsung koaktivator (*Direct binding coactivator competition*), (b) GR menghambat melalui fosforilasi *C-terminal domain* (CTD) dari RNA Polimerase II sehingga mengganggu stimulasi transkripsi NF- B, (c) Represi transkripsi oleh GC melalui interaksi langsung protein-protein dengan subunit p65 NF- B sehingga mencegah ikatan NF-KB dengan DNA, (d) Menginduksi I B sehingga NF- B kembali ke sitoplasma.

Pada SNRS ekspresi subunit p65 NF B menurun dan terdapat peningkatan aktivasi subunit p65 NF B dibandingkan dengan SNSS, sehingga GR tidak bisa

menghambat subunit p65 NF B dengan baik. Pada SNRS yang terjadi adalah, di sitoplasma hanya terdapat sedikit subunit p65 NF B, sedangkan di nukleus jumlah subunit p65 NF B berlebihan sehingga tidak sesuai dengan GR yang ada, akibatnya subunit p65 NF B banyak yang tak terikat sehingga berikatan dengan DNA dan menghasilkan peningkatan transkripsi sehingga terjadi resistensi steroid.

3. 2 Hipotesis Penelitian

1. Hipotesis 1 (H1)

Terdapat penurunan ekspresi subunit p65 NF B pada penderita sindrom nefrotik resisten steroid dibandingkan dengan sindrom nefrotik sensitif steroid .

2. Hipotesis 2 (H2)

Terdapat peningkatan aktivasi subunit p65 NF B pada penderita sindrom nefrotik resisten steroid dibandingkan dengan sindrom nefrotik sensitif steroid.

2. Hipotesis 3 (H3)

Terdapat korelasi antara ekspresi subunit p65 NF B dan aktivasi subunit p65 NF B pada penderita sindrom nefrotik resisten steroid.

BAB 4

METODE PENELITIAN

Diteliti hubungan antara ekspresi dan aktivasi subunit p65 NF- B dengan respon terhadap steroid pada sindrom nefrotik resisten steroid.

4. 1 Rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan *cross sectional*. Tujuan penelitian ini untuk melihat adanya perbedaan ekspresi dan aktivasi subunit p65 NF- B pada sindrom nefrotik resisten steroid dan melihat apakah ada korelasi di antara keduanya.

4.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium/SMF Ilmu Kesehatan Anak RSUD Dr. Saiful Anwar Malang dan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, mulai bulan Januari 2009 sampai dengan Desember 2009.

4.3 Populasi penelitian

Populasi penelitian ini adalah penderita sindrom nefrotik idiopatik yang dirawat di Laboratorium/SMF Ilmu Kesehatan Anak RSUD Dr. Saiful Anwar Malang. Kriteria diagnosis sindrom nefrotik adalah sesuai dengan Studi Kolaboratif Penyakit Ginjal Anak di Indonesia (1989) dengan modifikasi *International Study of Kidney Diseases on Children (ISKDC)* 1978, adalah sebagai berikut: edema, proteinuria masif (2+ atau pemeriksaan kuantitatif 40 mg/m²LPB/jam atau 1g/L dalam 24 jam/Esbach), hipoalbuminemia 2,5 g/dL, hiperkolesterolemia (> 250 mg/dL).

Semua penderita sindrom nefrotik idiopatik dijelaskan mengenai penelitian dan diminta menandatangani persetujuan dari orang tua (*informed consent*).

4.4 Persetujuan penelitian

Penelitian ini telah disetujui Panitia Etik Penelitian Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/RSU Dr. Saiful Anwar Malang.

4.5 Sampel Penelitian

Subjek penelitian ini adalah penderita sindrom nefrotik idiopatik resisten steroid dan sindrom nefrotik idiopatik sensitif steroid. Kriteria sindrom nefrotik resisten steroid adalah tidak terjadi remisi pada pengobatan prednison dosis penuh (*full dose*) 2 mg/kgBB/hari selama 4 minggu. Kriteria sindrom nefrotik sensitif steroid adalah terjadi remisi pada pengobatan prednison dosis penuh (*full dose*) 2 mg/kgBB/hari selama 4 minggu. Adapun remisi adalah proteinuria negatif atau *trace* (proteinuria < 4 mg/m²LPB/jam) 3 hari berturut-turut dalam 1 minggu.

4.6 Kriteria inklusi dan eksklusi sampel

4.6.1 Kriteria inklusi subjek penelitian:

1. Tergolong sindrom nefrotik idiopatik
2. Penderita SNSS dan SNRS
3. Usia antara 1 sampai 14 tahun
4. Keluarga penderita mengizinkan anaknya diikutsertakan dalam penelitian setelah diberikan penjelasan (*informed consent*)

4.6.2 Kriteria eksklusi subjek penelitian :

1. Penderita sindrom nefrotik sekunder, yaitu sindrom nefrotik yang penyebabnya berasal dari luar ginjal seperti terpapar oleh zat kimia/obat-obatan, berasal dari penyakit sistemik seperti: lupus eritematosus, purpura *Henoch Schonlein*, penyakit infeksi seperti malaria, hepatitis.
2. Penderita sindrom nefrotik kongenital/sindrom nefrotik infantil yaitu sindrom nefrotik yang mulai menunjukkan gejala dalam tahun pertama kehidupan.

4.7 Besar sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *consecutive sampling* berdasarkan jumlah pasien yang ada selama periode penelitian, yaitu antara Januari 2009 – Juni 2009. Dengan demikian, besar total sampel = 40 sampel, kasus sindrom nefrotik resisten steroid = 20 sampel, kasus sindrom nefrotik sensitif steroid = 20 sampel.

4.8. Variabel Penelitian

4.8.1. Variabel bebas

1. Sindrom nefrotik idiopatik sensitif steroid
2. Sindrom nefrotik idiopatik resisten steroid

4.8.2. Variabel tergantung

1. Ekspresi subunit p65 NF B
2. Aktivasi subunit p65 NF B

4.9. Definisi operasional

1. Sindrom nefrotik	Suatu sindrom klinik dengan gejala edema, proteinuria masif (2+ atau pemeriksaan kuantitatif 40 mg/m ² LPB/jam atau 1g/L dalam 24 jam/Esbach), hipoalbuminemia 2,5 g/dL, hiperkolesterolemia (>250 mg/dL)
2. Sindrom nefrotik sensitif steroid	Remisi pada pengobatan prednison dosis penuh (<i>full dose</i>) 2 mg/kgBB/hari selama 4 minggu
3. Sindrom nefrotik resisten steroid	Tidak terjadi remisi pada pengobatan prednison dosis penuh (<i>full dose</i>) 2 mg/kgBB/hari selama 4 minggu
4. Remisi	Proteinuria negatif atau <i>trace</i> (proteinuria < 4 mg/m ² LPB/jam) 3 hari berturut-turut dalam 1 minggu

5. Ekspresi subunit p65 NF B	Ekspresi subunit p65 NF B pada sel darah PBMC (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>) yang dianalisa menggunakan imunositokimia dengan antibodi monoklonal subunit p65 NF B (Neomarker#Rb.1648-po) dan tercatat coklat yang dinyatakan secara semikuantitatif dengan perhitungan subunit p65 NF B di sitoplasma per 200 sel.
6. Aktivasi subunit p65 NF B	Aktivasi subunit p65 NF B pada sel darah PBMC (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>) yang dianalisa menggunakan imunositokimia dengan antibodi monoklonal subunit p65 NF B (Neomarker#Rb.1648-po) dan tercatat coklat yang dinyatakan secara semikuantitatif dengan perhitungan subunit p65 NF B di nukleus per 200 sel.

4.10 METODE PEMERIKSAAN LABORATORIUM NF B

4.10.1 Alat:

Mikropipet 10-100µl; 200-100µL, *blue* dan *yellow tips*, inkubator kering, refrigerator, mikroskop Nikon OptiPhot 2A, *chamber*

4.10.2 Bahan *Immunostaining*:

Dako Staining Kit (Dako Inc. #K0678) yang berisi: *H2O2 endogenous blocking*, antibodi sekunder (Universal), SA-HRP (Horse Radix Peroxidase), DAB substrat, DAB Buffer, antibodi terhadap NF- B p65 (Neomarker#Rb.1648-po), *Mayer Hematoxilen* (Lab Vission), entelan (Merc), *cover glass*

4.11. Prosedur Penelitian

4.11.1 Isolasi PBMC

Darah dikoleksi pada tabung dengan heparin (antikoagulan). Diambil 500µL darah dan dimasukkan dalam tabung sentrifuse 1,5 mL dan ditambahkan 500µL PBS pH 7.4, diinversi sampai tercampur. Ditambahkan 1 cc *ficoll isopaque* (Histoplac – Sigma), diinversi sampai tercampur dan lakukan sentrifuse 1600 rpm selama 20 menit. Cincin *buffcoat* yang terseparasi di tengah campuran diambil. Dimasukkan ke dalam tabung *ependort* 1.5cc dan lakukan sentrifuse selama 3000 rpm selama 10 menit, cuci menggunakan PBS dan dilakukan sentrifuse pada 3000 rpm selama 10 menit. Sel yang didapat dipulaskan pada *slide glass* dan kering anginkan selama 15 menit pada suhu ruang. Dilakukan fiksasi menggunakan metanol absolut selama 15 menit, kemudian disimpan pada 4 °C sampai dilakukan pemeriksaan imunohistokimia.

Setiap sampel jaringan dibuat sediaan apusan, kemudian dideteksi:

- A. Pemeriksaan *Hematoxilen-Eosin*
- B. Pemeriksaan imunohistokimia subunit p65 NF B

4.11.2 Prosedur imunositokimia dan pengamatan ekspresi/aktivasi NF B pada limfosit

Dilakukan dengan menggunakan metode *streptavidin-biotin-peroksidase* (Dako, Carpinteria, USA). Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit, kemudian dilakukan *blocking endogenous* peroksida menggunakan 3% H₂O₂ selama 20 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit, kemudian *blocking unspecific protein* menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit, kemudian diinkubasi menggunakan *rabbit poliklonal subunit p65 anti NF B* (LabVision), selama 60 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit, kemudian inkubasi menggunakan *IgG anti rabbit HRP conjugated* selama 40 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit, kemudian ditetesi dengan DAB (*Diamino Benzedine*) dan diinkubasi selama 10 menit. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit, kemudian dicuci menggunakan dH₂O₂ selama 5 menit. Dilakukan *counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxilen* yang diinkubasi selama 10 menit dan dicuci menggunakan *tap water*, kemudian dibilas menggunakan dH₂O₂ dan dikering anginkan. Dilakukan *mounting* menggunakan entelan dan ditutup dengan *cover glass*, kemudian diamati pada mikroskop cahaya.

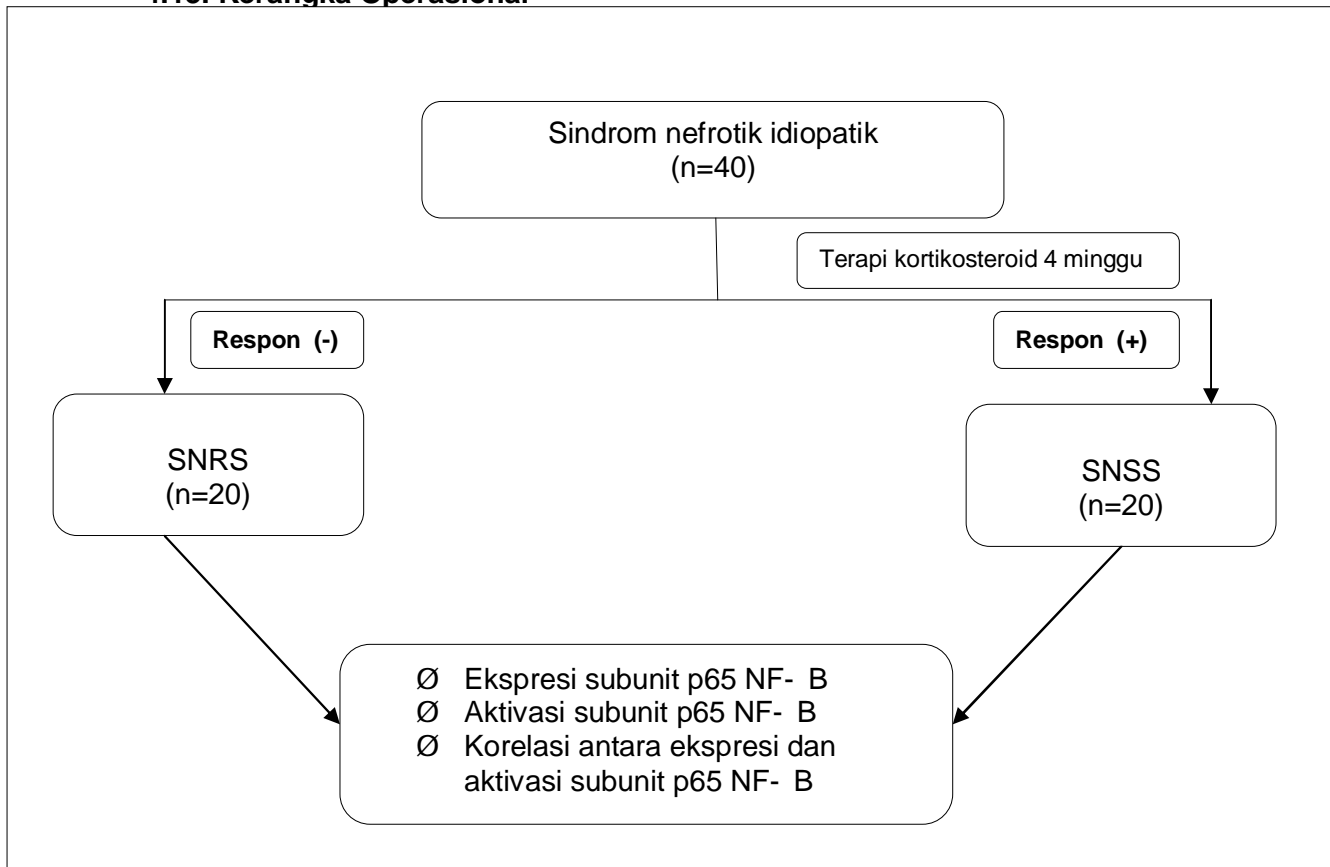
Untuk keperluan perhitungan, slide yang sudah berkode ditutup nomer kodenya dan diberi nomer baru secara acak. Sehingga

pemeriksa tidak mengetahui *slide* yang diperiksa merupakan sampel kelompok apa (*blind*). Pemeriksa terdiri dari 2 orang, yaitu peneliti dan disupervisi oleh ahli patologi anatomi. Pemeriksaan dan perhitungan sampel dilakukan secara terpisah antara kedua pemeriksa. Pemeriksaan dan perhitungan subunit p65 NF B, kemudian diamati ekspresi dan aktivasi subunit p65 NF B dilakukan menurut Soini *et al*, (1998) dan Pizem & Cor (2003) yang dimodifikasi, masing-masing *slide* pada bidang pandang dengan perbesaran 1000x dan sebanyak 200 sel. Hasil setiap perhitungan ditulis pada lembar kerja dan diambil nilai rata-rata per lapang pandang. Jika dilakukan pemulasan *Hematoxilen-Eosin* maka digunakan sebagai pembanding struktural dari sediaan. Analisis statistik bila semua hasil sudah dikembalikan ke kode sebenarnya. Dalam rangka menjamin representasi dan mengurangi kesalahan hasil, diperlukan pengamatan pada kurang lebih sejumlah 20 lapang pandang dengan perbesaran 1000x yang masing-masing berisi lebih kurang 1500 sel (Soini *et al*, 1998; Pizem & Cor, 2003).

4.12. Analisis Statistik

Variabel interval digunakan dalam bentuk persentase. Komparatif variabel diantara 2 kelompok digunakan statistika parametrik uji t dan uji korelasi Pearson dengan nilai interval kepercayaan 95%. Semua data dianalisis menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 17) for Windows*. Signifikan/bermakna bila menghasilkan nilai $p < 0,05$.

4.13. Kerangka Operasional



BAB 5

HASIL PENELITIAN

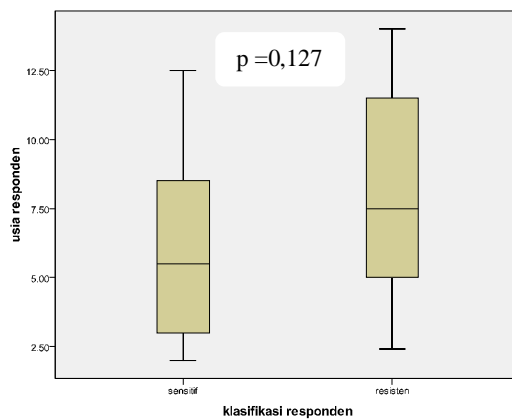
5.1 Karakteristik sampel

Karakteristik dasar sampel penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 5.1, Gambar 5.2, dan Tabel 5.1 di bawah ini:

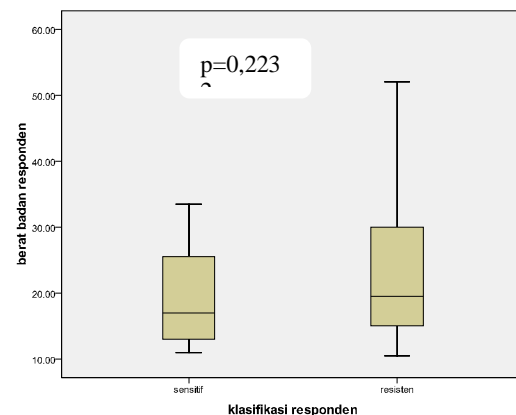
Tabel 5.1. Karakteristik dasar sampel pada kelompok SNRS dan SNSS

	SNRS (n= 20)	SNSS (n= 20)	<i>p</i>
Jenis kelamin			0,513
Laki-laki	12	14	
Perempuan	8	6	
Umur pasien (tahun)	7,8	5,9	0,127
Berat badan (kg)	23,86	18,88	0,223

* Perbedaan bermakna pada nilai $p < 0,05$



Gambar 5.1 Karakteristik sampel berdasarkan usia



Gambar 5.2 Karakteristik sampel berdasarkan berat badan

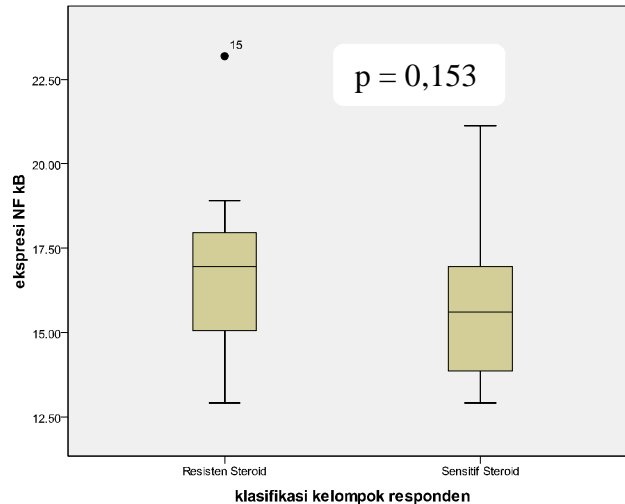
Gambar 5.1, Gambar 5.2, dan Tabel 5.1. diatas menggambarkan karakteristik penderita sindrom nefrotik idiopatik yang menjadi sampel pada penelitian ini. Pada tabel tersebut terlihat karakteristik penderita yang menjadi

sampel penelitian ini untuk jenis kelamin, umur dan berat badan tidak ada perbedaan yang bermakna.

5.2 Perbandingan Ekspresi Subunit p65 NF-KB antara Kelompok SNRS dan SNSS

Telah dilakukan pemeriksaan imunositokimia terhadap ekspresi dan aktivasi subunit p65 NF- B pada sel PBMC dari sampel darah pasien anak yang menderita SNRS (20 orang) dan anak yang menderita SNSS (20 orang).

ekspresi NF kB

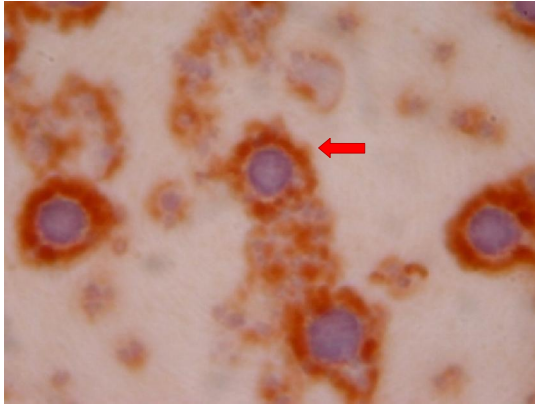


Gambar 5.3 Perbandingan Ekspresi subunit p65 NF- B pada Kedua Kelompok (SNRS & SNSS)

Pada pengamatan ekspresi subunit p65 NF-KB, didapatkan hasil tidak ada perbedaan yang bermakna kadar ekspresi subunit p65 NF-KB antara kelompok SNRS dengan kelompok SNSS ($p=0,153$).

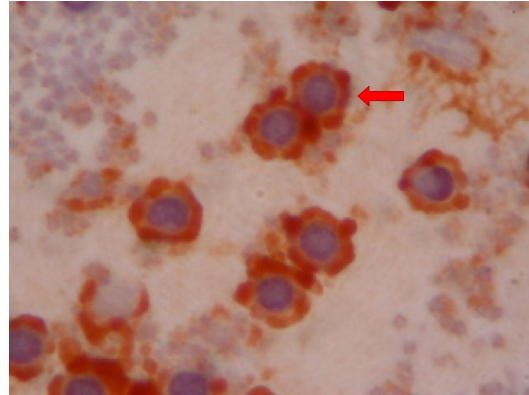
Hasil pemeriksaan imunositokimia ekspresi subunit p65 NF- B tampak pada gambar dibawah ini:

SNRS



(A)

SNSS



(B)

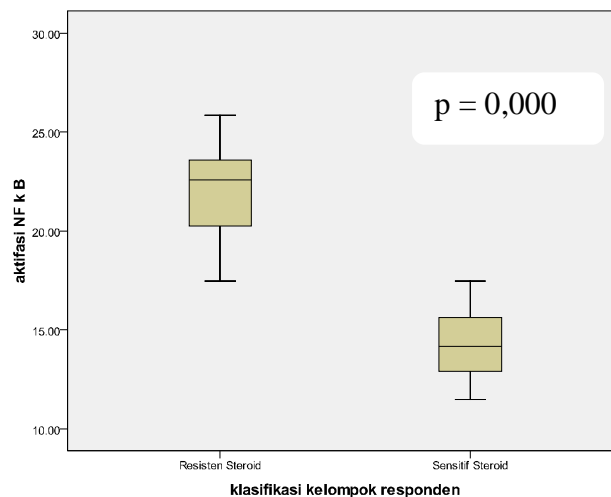
Gambar 5.4 Ekspresi Subunit p65 NF-KB pada Penderita SNRS (A) dan Penderita SNSS (B) dengan Teknik Imunositokimia

Keterangan :

Panah merah menunjuk pada warna coklat pada sitoplasma yang menunjukkan ekspresi subunit p65 NF- B di sitoplasma

5.3 Perbandingan Aktivasi subunit p65 NF- B antara Kelompok SNSS dan SRNS

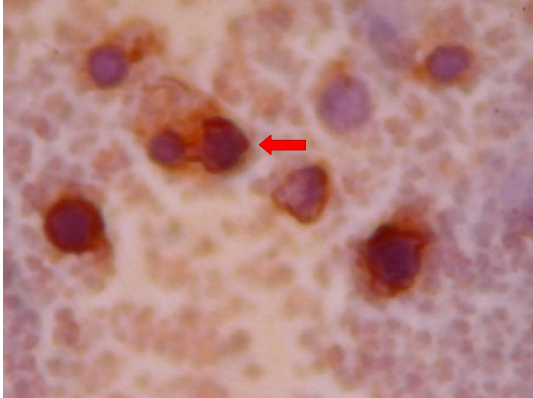
aktivasi NF k B



Gambar 5.5 Perbandingan Aktivasi subunit p65 NF- B pada Kedua Kelompok (SNRS & SNSS)

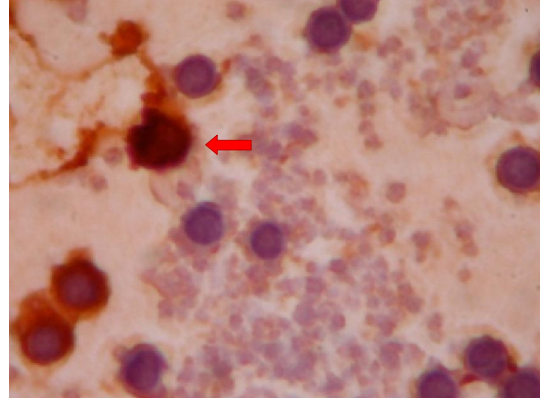
Pada pengamatan kadar aktivasi subunit p65 NF-KB, didapatkan aktivasi yang lebih tinggi pada kelompok penderita anak dengan SNRS dibandingkan dengan kelompok SNSS dengan perbedaan yang bermakna ($p=0,000$).

SNRS



(A)

SNSS



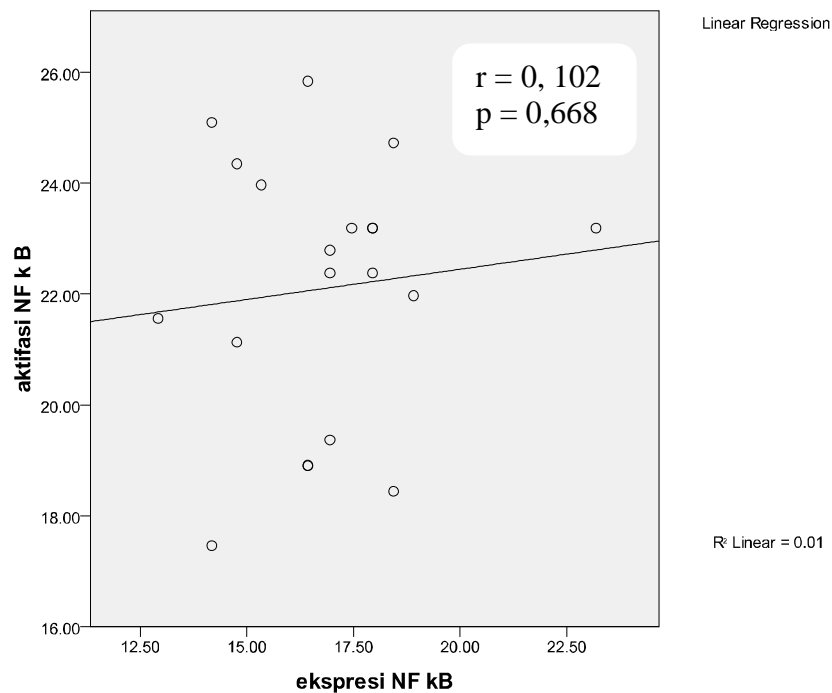
(B)

Gambar 5.6 Aktivasi Subunit p65 NF-KB pada Penderita SNRS (A) dan Penderita SNSS (B) dengan Teknik Imunohistokimia

Keterangan :

Panah merah menunjuk pada warna coklat pada sitoplasma yang menunjukkan aktivasi subunit p65 NF- B di nukleus

5.3 Hubungan antara Ekspresi subunit p65 NF- B dan Aktivasi subunit p65 NF- B



Gambar 5.7 Hubungan antara Ekspresi subunit p65 NF- B dan Aktivasi subunit p65 NF- B

Pada SNRS hubungan ekspresi subunit p65 NF- B dengan aktivasi subunit p65 NF- B jika dilakukan analisa statistik korelasi Pearson menunjukkan tidak ada korelasi antara aktivasi subunit p65 NF- B dan ekspresi subunit p65 NF- B, dengan nilai *significant 2 tailed* (r)= 0,102, p =0,668.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan penelitian *cross sectional* untuk membuktikan adanya pengaruh ekspresi dan aktivasi subunit p65 terhadap resistensi steroid pada anak. Berbeda dengan penelitian eksperimental, pada penelitian deskriptif observasional ini tidak diberikan efek perlakuan atau intervensi pada subyek penelitian. Perbedaan ekspresi dan aktivasi pada kedua kelompok penelitian diamati dan dianalisis. Untuk memenuhi rancang bangun penelitian deskriptif observasional, maka penderita dikelompokkan dalam kelompok SNRS dan SNSS.

Berdasarkan *consecutive sampling*, selama masa penelitian didapat 20 sampel pada tiap kelompok. Pada penelitian ini didapatkan 40 sampel dengan masing-masing kelompok 20 sampel, sehingga data dapat dianalisis sesuai rencana. Rerata umur subyek dalam penelitian ini tidak berbeda bermakna demikian juga jenis kelamin dan berat badan kedua kelompok tidak berbeda secara bermakna.

Penelitian ini menggunakan sel PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) yang sebagian besar terdiri dari sel T. Banyak bukti yang menyatakan bahwa sel T berperan pada patogenesis sindrom nefrotik idiopatik. Sehingga, respon pada terapi glukokortikoid mungkin terlibat pada *glucocorticoid receptor-mediated signaling pathway* pada sel T. Jika respon steroid pada sindrom nefrotik merupakan hasil kerja glukokortikoid pada sel T, maka sel T dari pasien dengan SNRS dan SNSS seharusnya menunjukkan beberapa perbedaan. Khususnya, sebuah hipotesis bahwa sel T pada penderita SNRS memiliki beberapa aktivitas reseptor glukokortikoid yang diinduksi sinyal intraselular.

Penelitian ini dilakukan berdasarkan hipotesis bahwa resistensi pada terapi glukokortikoid adalah diperantarai oleh aktivasi faktor transkripsi dan produksi limfokin yang menginisiasi dan mempertahankan respon inflamasi yang diperantarai sebagian besar oleh sel T (Aviles, 2004). Konsep aktivitas supresi kompetitif ini didukung oleh bukti bahwa pada beberapa kasus resisten steroid dapat teratasi dengan terapi glukokortikoid intravena dengan dosis yang sangat besar. (Mendoza, 1990). Terdapat beberapa mediator potensial resistensi sel T pada glukokortikoid. IL-2 dan IL-4 menginduksi resistensi glukokortikoid pada kultur limfosit normal.(Walker, 1987; Kam, 1993). Penelitian lain menyebutkan didapatkan gangguan fungsi sel T regulator pada penderita SNRS (Araya, *et al.*, 2009)

Pada penelitian ini digunakan parameter NF- B subunit p65. Kelainan pada aktivasi NF- B banyak ditemukan pada pasien dengan kelainan imunologis seperti pasien *sistemic lupus erythematosus* (SLE). Aktivasi NF- B menurun secara signifikan pada pasien dengan SLE (Wong, *et al.*, 1999). Pada salah satu hasil penelitian *in vivo* disebutkan bahwa hanya sub unit p65 yang bisa secara langsung berhubungan dengan DNA pada keadaan heterodimer dengan sub unit p50, dan bahkan pada kondisi homodimer p65. Hal ini menunjukkan bahwa p65 lebih aktif untuk melakukan transkripsi jika dibandingkan dengan p50, hasil penelitian tersebut menjelaskan adanya kelainan pada transkripsi gen maupun sitokin pada penderita kelainan imunologis (Ray & Prefontaine, 1994). Penelitian dengan menggunakan sel Cos-1 yang mengandung GR dan beberapa NF- B menunjukkan pentingnya subunit p65 pada transrepresi oleh GR. Hanya sel-sel yang mengandung heterodimer p65/p50 atau homodimer p65 homodimer yang sensitif terhadap

steroid. Sel yang hanya mengandung homodimer p50 tidak merespon terhadap steroid. (McKay & Cidlowski, 1998). Penelitian lain membuktikan bahwa pada pasien dengan SNSS saat mengalami relaps didapatkan peningkatan ekspresi heterodimer p65/p50 NF- B dan terdapat penurunan ekspresi NF- B ketika pasien mendapat terapi deksametason (Cao, 2002). Para peneliti tersebut yakin bahwa hambatan pada NF- B merupakan mekanisme potensial efek glukokortikoid pada anak dengan sindrom nefrotik.

Faktor transkripsi NF- B penting pada aktivasi banyak gen proinflamasi. Penelitian tentang hal ini telah dilaporkan pada asma dan kanker, dimana faktor transkripsi ini mempengaruhi kerja glukokortikoid (Barnes, 1996; Ray A, 1994), namun penelitian tentang peran faktor transkripsi NF- B pada sindrom nefrotik hanya sedikit dan meneliti pada ekspresinya saja atau aktivasinya saja (Schachter, *et al.*, 2000; Sahali, 2001; Aviles, 2004; Hong-Yang, 2005;).

Penelitian sebelumnya tentang sindrom nefrotik menunjukkan penurunan ekspresi subunit p65 NF- B, sementara ekspresi subunit p50 adalah tidak didapatkan perbedaan signifikan, baik pada kelompok SNRS maupun SNSN (Aviles, 2004). Sebaliknya penelitian lain mendapatkan peningkatan ekspresi NF-kB & gen angiotensinogen berhubungan dengan R-FSGS, dan juga didapatkan peningkatan rasio NF-kB:IkB (Schachter, *et al.*, 2000). Sementara itu didapatkan dua penelitian tentang aktivasi subunit p65 NF- B yang hasilnya adalah didapatkan peningkatan ikatan NF- B-DNA (Sahali, 2001) dan pada penelitian lain didapatkan peningkatan aktivasi NF-kB berhubungan dengan buruknya respon terhadap terapi kortikosteroid (Hong-Yang, 2005). Penelitian yang menghubungkan ekspresi dan aktivasi subunit p65 NF- B sampai saat ini belum dilakukan.

Pada penelitian ini, dibuktikan bahwa ternyata tidak terdapat perbedaan bermakna pada ekspresi subunit p65 NF- B pada kelompok SNRS dan SNSS ($p=0,153$), sebaliknya ditemukan suatu fakta baru yaitu dengan didapatkan adanya perbedaan aktivasi subunit p65 NF- B antara kelompok SNRS dengan SNSS dimana didapatkan peningkatan aktivasi yang sangat tinggi pada kelompok SNRS ($p=0,000$). Hal ini dapat dijelaskan karena mekanisme dasar aktivasi NF- B adalah perubahan heterodimer NF- B yang tertahan di sitoplasma oleh I B. Jika ada sinyal yang mengaktivasi akan mengakibatkan IKK memfosforilasi IKB sehingga IKB mengalami ubiquinasi & degradasi melalui proteasom, sementara PKAc memfosforilasi subunit p65 NF- B. Proses aktivasi ini mengekspos NLS (*nuclear localization signal*) pada subunit p65, sehingga heterodimer NF- B menjadi teraktivasi dan berpindah ke nukleus dimana akan berinteraksi dengan elemen *kB-responsive elements* pada kromatin dan memodulasi transkripsi gen (McKay & Cidlowski, 1999). Sehingga diperlukan penelitian lanjutan untuk memeriksa faktor-faktor lain yang kemungkinan mempengaruhi aktivasi subunit p65 NF- B, antara lain: IKK, IKB, PKAc, dan NLS.

Penelitian ini menunjukkan tidak adanya korelasi antara ekspresi dan aktivasi subunit p65 NF- B ($r=0,102$, $p=0,668$), hal ini menunjukkan bahwa adanya faktor-faktor lain yang mengaktivasi subunit p65 NF- B secara berlebihan, yaitu karena gangguan pada IKK, IKB, NLS, dan PKAc. Peningkatan yang signifikan dari aktivasi subunit p65 NF- B pada kelompok anak penderita SNRS, menunjukkan adanya proses aktivasi NF- B yang berlebihan sehingga membuat terjadinya proses transkripsi gen-gen sitokin inflamatori yang berlebihan. Peningkatan produksi sitokin proinflamasi yang akan mendasari

mekanisme resistensi steroid. (Jain & Loh, 1995). IL-2 merupakan salah satu sitokin pro inflamatori yang diregulasi oleh NF- B, dan didapatkan berlebihan kadarnya pada penelitian sebelumnya (Aviles, 2004). Penelitian lain juga membuktikan bahwa pada limfosit penderita resisten steroid didapatkan tingginya aktivitas IL-2 yang signifikan dibandingkan dengan limfosit penderita sensitif steroid (Walker, 1987). Namun peningkatan produksi sitokin proinflamasi lain juga masih perlu diteliti perannya. Sehingga sebenarnya diperlukan penelitian lanjutan dengan pemeriksaan petanda (*marker*) sitokin proinflamasi bersamaan dengan pemeriksaan subunit p65 NF- B.

Penelitian ini adalah penelitian *in vivo*, sehingga dapat memberikan gambaran patofisiologi SNRS, tetapi hasil penelitian dipengaruhi banyak faktor. Terdapat keterbatasan pada penelitian ini, yaitu penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *cross sectional*, sehingga pengambilan sampel data hanya dilakukan pada satu waktu saja dan beberapa sampel penelitian ini ada yang diambil darahnya setelah mendapat terapi siklofosamid sedangkan siklofosamid memiliki efek represi yang lebih kuat terhadap reaksi inflamasi sehingga mempengaruhi hasil penelitian. Selain itu seharusnya juga dilakukan pengujian parameter lain, seperti IKK, IKB, NLS, dan PKAc karena semua parameter tersebut memiliki pengaruh pada proses aktivasi subunit p65 NF- B, sehingga dapat diketahui apakah perubahan yang terjadi pada subunit p65 NF- B terjadi karena ada pengaruh faktor lain atau tidak. Keterbatasan lain dari penelitian ini adalah tidak dilakukan pemeriksaan ada tidaknya alergi pada subyek penelitian. Diketahui bahwa pasien dengan sindrom nefrotik idiopatik didapatkan peningkatan serum imunoglobulin E disebabkan terjadi peningkatan kadar interleukin13 yang dapat menginduksi secara langsung ekspresi CD80

pada podosit sehingga menyebabkan proteinuria, namun belum terbukti tipe alergi yang berhubungan dengan sindrom nefrotik (Abdel,*et al* ., 2009)

BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini, dapat diambil suatu kesimpulan :

1. Tidak ada perbedaan ekspresi subunit p65 NF- B pada kelompok dengan SNRS dan SNSS.
2. Didapatkan peningkatan aktivasi subunit p65 NF- B pada kelompok SNRS, namun peningkatan aktivasi subunit p65 NF- B bukan merupakan penyebab resistensi steroid pada sindrom nefrotik.
3. Peningkatan aktivasi subunit p65 NF- B ditemukan pada penderita sindrom nefrotik resistensi steroid, namun tidak berhubungan dengan ekspresi subunit p65 NF- B.

7.2 Saran

1. Diperlukan penelitian lanjutan dengan pemeriksaan petanda (*marker*) sitokin proinflamasi bersamaan dengan pemeriksaan subunit p65 NF- B.
2. Diperlukan penelitian lanjutan untuk memeriksa faktor-faktor lain yang kemungkinan mempengaruhi aktivasi subunit p65 NF- B, antara lain: IKK, IKB, PKAc, dan NLS.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Hafez , Shimada , Lee, *et al.* 2009. Idiopathic nephrotic syndrome and atopy: is there a common link? *Am J Kidney Dis.* **54**(5):945-53.
- Araya, Diaz, Wasserfall, *et al.* 2009. T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* **24**:1691–8.
- Aviles, Vehaskari V.M., Manning J., Ochoe A.C., Zea A.H. 2004. Decreased expression of T-cell NF- B p65 subunit in steroid-resistant nephrotic syndrome. *Kidney International*; **66**: 60–7.
- Ayrolidi E., Migliorati G., Bruscoli S., *et al.*, 2001. Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor B. *Blood*; **98**: 743-53
- Bagga A., Mantan M. 2005. Nephrotic syndrome in children. *Indian J Med Res*; **122**: 13-28.
- Baldwin, 2001. The NF- B and I B Proteins: New Discoveries and Insights. *Annu. Rev. Immunol.* ; **14**:649–81.
- Cao, Lu S., Zhao C.D.R. 2001. Abnormal DNA-binding of transcription factors in minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*; **16**:790–5.
- Cho, Hong E.H., Lee T.H., Ko C.W. 2007. Pathophysiology of minimal change nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology*; **12**: S11–S14.
- Cunard R, Kelly CJ. T cells and minimal change disease. 2002. *J Am Soc Nephrol.* **13**: 1409-11.
- De Bosscher, Berghe V.W, Vermeulen L., Plaisance S., Boone S., Haegeman G. 2000. Glucocorticoids repress NF-kB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *PNAS*; **97**(8): 3919–24.
- Dutta, Fan Y., Gupta N., Fan G., Gelinas C. 2006. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- B. *Oncogene* ; **25**: 6800–816.
- Eddy AA, Symons JM. 2003. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet* ; 362: 629–39.
- Gerondakis S, Grossmann M, Nakamura Y, Pohl T, Grumont R. 1999. Genetic approaches in mice to understand Rel/NF- B and I B function: transgenics and knockouts. *Oncogene*; **18**:6888–95.
- Ghosh S, Karin M. 2002. Missing pieces in the NF- B puzzle. *Cell* ;**109**(Suppl):S81–S96
- Grimbert P., Audard V., Remy P., Lang P., Sahali D. 2003. Recent approaches to the pathogenesis of minimal-change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*; **18**: 245–248.
- Hernandez, Guerrero G.C., Egido J. 1999. In situ non-radioactive detection of nuclear factors in paraffin sections by Southwestern histochemistry. *Kidney Int*; **55**:209–14.
- Hikes BG. 2008. NPHS3; new clues for understanding idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* **23**: 847–50.

- Hodson EM, Willis NS, Craig JC. 2007. Corticosteroid therapy for nephrotic syndrome in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*; **4**: 1-61.
- Hong-Yang, Ruo-Peng, Jun-Hua, Jun-Hui. 2005. Relations of NF-KB Activity in the Kidney of Children with Primary Nephrotic Syndrome to Clinical Manifestations, Pathological Types, and Urinary Protein Types. *China Med J.*; **118**(10): 854-6.
- Hui-Kim Yap, Cheung W., Murugasu B., Sim S.K., Seah C.C., Stanley C. 1999. Th1 and Th2 Cytokine mRNA Profiles in Childhood Nephrotic Syndrome: Evidence for Increased IL-13 mRNA Expression in Relapse. *J Am Soc Nephrol*; **10**: 529–37.
- Houllthofer H. 2007. Molecular architecture of the glomerular slit diaphragm: lessons learnt for a better understanding of disease pathogenesis. *Nephrol Dial Transplant*. **22**: 2124-8.
- Inflammation. *Mechanisms of Ageing and Development* ; **125**: 697–706.
- Israel A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- B? *Trends Israel, Kromer G.* 2006. NF- B in life/death decisions: an introduction. *Cell Death and Differentiation* ; **13**: 685–86.
- Jain, J., C. Loh, A. Rao. 1995. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr. Opin. Immunol*; **7**:333.
- Krisni. Pola penyakit ginjal pada anak di RS Saiful Anwar Malang tahun 2002-2006. Disampaikan pada Pertemuan Ilmiah Tahunan Ilmu Kesehatan Anak Ikatan Dokter Anak Indonesia (PIT IKA-IDAI), Yogyakarta, 2007.
- Lama, Luongo I, Tirino G, Borriello A, Carangio C, Salsano ME. 2002. Expression level of c-FLIP versus Fas determines susceptibility to Fas ligand-induced cell death in murine thymoma EL-4 cells¹. *Am. J. Kidney Disease*; **5**: 123-30.
- Lawrence , Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. 2001. Possible new role for NF- B in the resolution of inflammation. *Nat Med* ;**7**:1291–7
- McKay, Cidlowski J.A. 1999. Molecular Control of Immune/Inflammatory Responses: Interactions Between Nuclear Factor- B and Steroid Receptor-Signaling Pathways. *Endocrine Reviews*; **20**(4): 435–59.
- McKay, Cidlowski J.A. 1998 Cross-Talk between nuclear factor- B and the steroid hormone receptors; mechanism of mutual antagonism. *Mol Endo*; **12**:45–56, 1998
- Mezzano S., Barria M., Droguett M.A., *et al.*, 2001. Tubular NF- B and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney International*; **60**: 1366–77.
- Moller CC, Pollak MR, Reiser J. 2006. The genetic basis of human glomerular Disease. *Advances in Chronic Kidney Disease*. **13** (2): 166-73.
- Niaudet P. 2004. Genetic form of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. **19**: 1313-18.
- Niaudet P. 2004. Podocin and nephrotic syndrome: implications for clinicians. *J Am Soc Nephrol* **15**: 832-4.
- Obeidova H. 2006. Genetic basis of nephrotic syndrome -review. *Prague Med Report* . **107**(1): 5-16.
- Orth S, Ritz E, 1998. The Nephrotic Syndrome. *NEJM*; **23**: 1202-11.
- Otukesh. 2009. NPHS2 Mutations in Children With Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *IJKD* ;**3**:99-102
- Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. 2003. Cell biology of glomerular podocyte. *Physiol Rev*. **23**: 254-94.

- Perkins, Gilmore T.D. 2006. Good cop, bad cop: the different faces of NF- B. *Cell Death and Differentiation* ; **13**: 759–72.
- Perkins. 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF- B and IKK function. *Molecular Cell Biology* ; **8**: 49-62.
- Pizem J, Cor A. 2003, Detection of Apoptosis Cells in Tumour Paraffin Section, *Radiol. Onco*, 37(4): 225-232
- Rangan G.K, Wang Y., Tay Y.C., Haris D. 1999. Inhibition of nuclear factor- B activation reduces cortical tubulointerstitial injury in proteinuric rats. *Kidney International*; **56**: 118-34.
- Ray A., Prefontaine K.E. 1994. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **91**: 752-56.
- Sahali. 2001. Transcriptional and Post-Transcriptional Alterations of I B in Active Minimal-Change Nephrotic Syndrome. *J Am Soc Nephrol*; **12**: 1648–58.
- Schachter. 2000. Increased Nuclear Factor- B and Angiotensinogen Gene Expression in Posttransplant Recurrent Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Transplantation*; 70(7): 1107-10
- Sheppard. 1998. Nuclear Integration of Glucocorticoid Receptor and Nuclear Factor-kB Signaling by CREB-binding Protein and Steroid Receptor Coactivator-1mn. *The Journal of Biological Chemistry* ; **273**: 29291–4.
- Smoak, John A. C. 2004. Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Signaling During Inflammation. *Mechanisms of Ageing and Development* ; **125**: 697–706.
- Soini Y, Paakko P, and Lehto V.P. 1998, Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer. *American Journal of Pathology*, 153(4): 1041-1048
- Tak PP, Firestein GS. 2001. NF- B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*; **107**:7–11.
- Tam, Wang, Sen. Cell specific association and shuttling of IkappaBalpha provide mechanism for nuclear NF-kappaB in B lymphocytes. *Mol Cell Biol* 2001;**21**:4837–46.
- UKK Nefrologi. 2008. Konsensus Tata Laksana Sindrom Nefrotik Idiopatik pada Anak. Jakarta.
- Valanciute A., Gouvello S., Solhonne B. 2004. NF- B p65 Antagonizes IL-4 Induction by c-maf in Minimal Change Nephrotic Syndrome. *The Journal of Immunology*; **172**: 688–98.
- Van den Berg, J. J. Weening. 2004. Role of Immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Clinical Science*; **107**:125-36.
- Vatz AN. 2005. Genetic idiopathic nephrotic syndrome. *Indian J Pediatr*. **72**(9): 777-83.
- Wardle. 2001. NF- B for the Nephrologist. *Nephrol Dial Transplant*; **16**: 1764-8.
- Zachwieja. 2002. Intracellular cytokines of peripheral blood lymphocytes in nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* ; **17**: 733–40.

1. Pengobatan prednison dosis penuh (*full dose*) 2 mg/kgBB/hari selama 4 minggu pada pasien sindrom nefrotik pada anak (sebagai terapi standar).
2. Setelah 4 minggu, seluruh penderita akan dilihat responnya terhadap terapi steroid, dan dikelompokkan menjadi dua kelompok yaitu sensitif steroid dan resisten steroid.
3. Pada kedua kelompok akan diambil darah melalui pembuluh darah vena perifer. Darah disimpan dalam tabung kemudian dilakukan sentrifugasi dan dilakukan isolasi PBMC, selanjutnya dibuat sediaan dan dilakukan pemeriksaan imunohistokimia

Lampiran 2. Hasil Perhitungan Statistik

2.1 Karakteristik Pasien

Descriptives			Statistic	Std. Error
klasifikasi responden	Mean		1.50	.080
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.34	
		Upper Bound	1.66	
	5% Trimmed Mean		1.50	
	Median		1.50	
	Variance		.256	
	Std. Deviation		.506	
	Minimum		1	
	Maximum		2	
	Range		1	
	Interquartile Range		1	
	Skewness		.000	.374
	Kurtosis		-2.108	.733
usia responden	Mean		6.9150	.56108
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	5.7801	
		Upper Bound	8.0499	
	5% Trimmed Mean		6.7833	

	Median		6.0000	
	Variance		12.593	
	Std. Deviation		3.54860	
	Minimum		2.00	
	Maximum		14.00	
	Range		12.00	
	Interquartile Range		6.13	
	Skewness		.429	.374
	Kurtosis		-.954	.733
jenis kelamin responden	Mean		1.35	.076
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.20	
		Upper Bound	1.50	
	5% Trimmed Mean		1.33	
	Median		1.00	
	Variance		.233	
	Std. Deviation		.483	
	Minimum		1	
	Maximum		2	
	Range		1	
	Interquartile Range		1	
	Skewness		.654	.374
	Kurtosis		-1.658	.733
berat badan responden	Mean		21.3750	1.60071
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	18.1373	
		Upper Bound	24.6127	
	5% Trimmed Mean		20.3194	
	Median		18.0000	
	Variance		102.491	
	Std. Deviation		10.12379	
	Minimum		10.50	
	Maximum		52.00	
	Range		41.50	
	Interquartile Range		12.60	
	Skewness		1.476	.374
	Kurtosis		2.136	.733

Mann-Whitney Test

Ranks

	klasifikasi responden	N	Mean Rank	Sum of Ranks
usia responden	sensitif	20	17.68	353.50
	resisten	20	23.33	466.50
	Total	40		
berat badan responden	sensitif	20	18.25	365.00
	resisten	20	22.75	455.00
	Total	40		

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
klasifikasi responden	.338	40	.000	.637	40	.000
usia responden	.152	40	.021	.935	40	.023
jenis kelamin responden	.416	40	.000	.604	40	.000
berat badan responden	.156	40	.016	.852	40	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Test Statistics^b

	usia responden	berat badan responden
Mann-Whitney U	143.500	155.000
Wilcoxon W	353.500	365.000
Z	-1.532	-1.219
Asymp. Sig. (2-tailed)	.126	.223
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.127 ^a	.231 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: klasifikasi responden

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.440 ^a	1	.507	.741	.371
Continuity Correction ^b	.110	1	.740		
Likelihood Ratio	.441	1	.507		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	.429	1	.513		
N of Valid Cases	40				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7.00.

b. Computed only for a 2x2 table

2.2 Distribusi Normal

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
aktifasi NF k B	.138	40	.052	.918	40	.007
ekspresi NF kB	.096	40	.200*	.951	40	.083

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

2.3 Perhitungan t-test Variabel Ekspresi dan Aktivasi subunit p65 NF- B

Descriptives			Statistic	Std. Error
aktifasi NF k B	Mean		18.1110	.71554
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	16.6637	
		Upper Bound	19.5583	
	5% Trimmed Mean		18.0683	
	Median		17.4600	
	Variance		20.480	
	Std. Deviation		4.52546	

	Minimum	11.50	
	Maximum	25.84	
	Range	14.34	
	Interquartile Range	8.51	
	Skewness	.160	.374
	Kurtosis	-1.456	.733
ekspresi NF kB	Mean	16.3028	.36616
	95% Confidence Interval for		
	Mean	Lower Bound	15.5621
		Upper Bound	17.0434
	5% Trimmed Mean	16.1653	
	Median	16.4300	
	Variance	5.363	
	Std. Deviation	2.31579	
	Minimum	12.92	
	Maximum	23.19	
	Range	10.27	
	Interquartile Range	3.62	
	Skewness	.642	.374
	Kurtosis	.692	.733

2.3.1 Perbandingan Ekspresi Subunit p65 NF- B pada Kedua Kelompok

No	Ekspresi subunit p65 NF- B		Uji t
	SNSS	SNRS	
1.	17	12	p= 0,153
2.	21	16	
3.	16	14	
4.	13	18	
5.	10	16	
6.	11	13	
7.	10	19	
8.	26	12	
9.	21	19	
10.	20	10	
11.	12	13	
12.	11	21	
13.	14	16	
14.	13	17	
15.	12	31	
16.	15	17	
17.	10	19	
18.	15	31	
19.	17	20	
20.	16	20	
Mean ± SD	15,7760 ± 2,33249	16,8295 ± 2,23234	

Group Statistics

klasifikasi kelompok responden		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ekspresi NF kB	Resisten Steroid	20	16.8295	2.23234	.49917
	Sensitif Steroid	20	15.7760	2.33249	.52156

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					
								95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	
ekspresi NF kB	Equal variances assumed	.339	.564	1.459	38	.153	1.05350	.72194	- .40798 2.51498

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
									95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper	
ekspresi NF KB	Equal variances assumed	.339	.564	1.459	38	.153	1.05350	.72194	-.40798	2.51498
	Equal variances not assumed			1.459	37.927	.153	1.05350	.72194	-.40808	2.51508

2.3.2 Perbandingan Aktivasi Subunit p65 NF- B pada Kedua Kelompok

No	Aktivasi subunit p65 NF- B		
	SNSS	SNRS	
1.	12	18	p=0,000
2.	8	21	
3.	12	33	
4.	16	31	
5.	11	38	
6.	10	34	
7.	9	31	
8.	8	36	
9.	10	29	
10.	13	27	
11.	14	26	
12.	15	28	
13.	13	21	
14.	15	22	
15.	12	31	
16.	10	29	
17.	18	31	
18.	11	10	
19.	9	35	
20.	15	20	
Mean ± SD	14,1200 ± 1,68111	22,1020 ± 2,38297	

3.

Group Statistics

klasifikasi kelompok responden	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
aktifasi NF k B Resisten Steroid	20	22.1020	2.38297	.53285
Sensitif Steroid	20	14.1200	1.68111	.37591

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
aktifasi NF k B	2.165	.149	12.240	38	.000	7.98200	.65210	6.66189	9.30211
			12.240	34.158	.000	7.98200	.65210	6.65700	9.30700

2.4 Hubungan antara Ekspresi dan Aktivasi pada Kelompok SNRS

Correlations

	aktifasi NF k B	ekspresi NF kB
aktifasi NF k B Pearson Correlation	1	.102
Sig. (2-tailed)		.668
N	20	20
ekspresi NF kB Pearson Correlation	.102	1

Sig. (2-tailed)	.668	
N	20	20